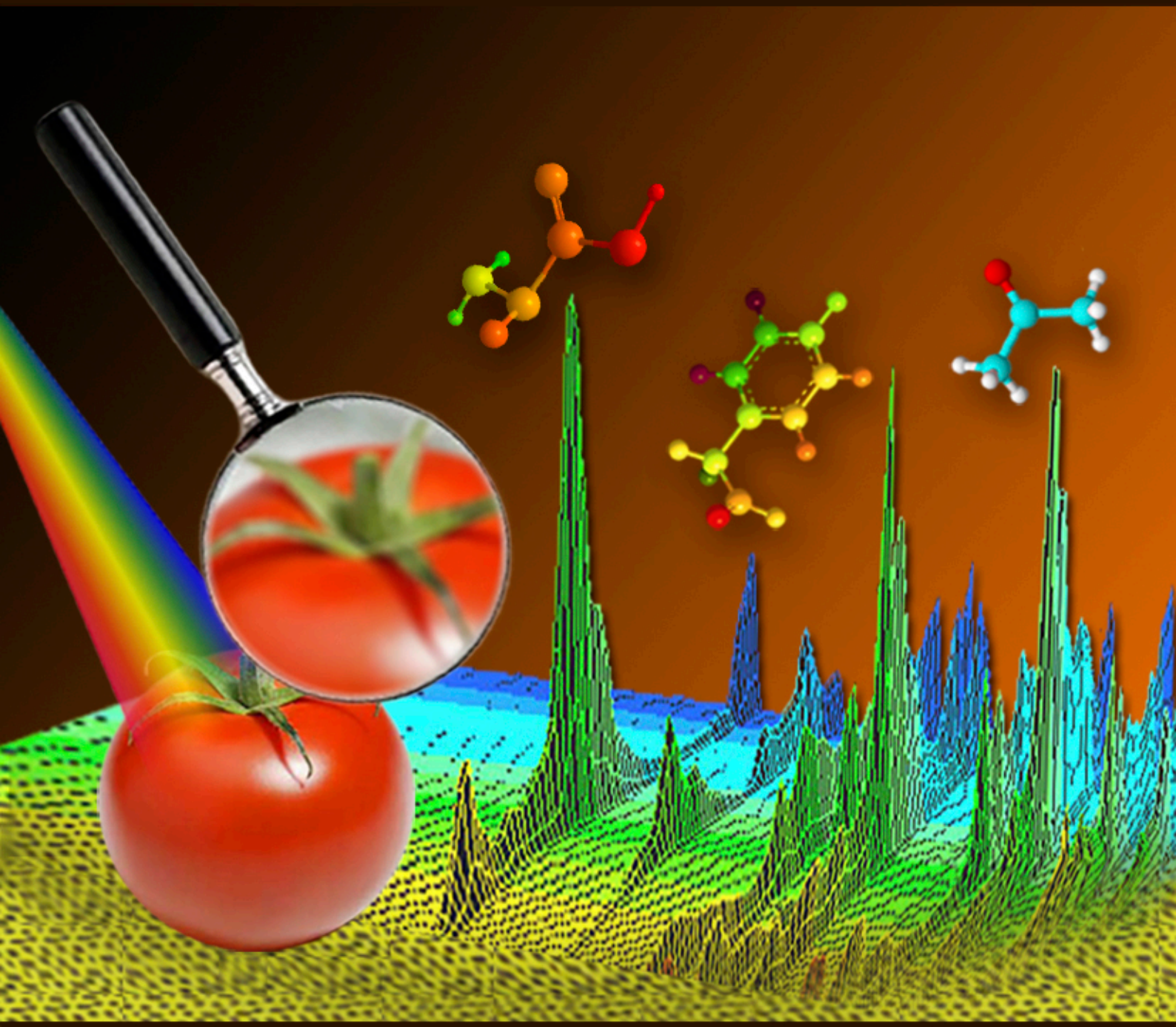
Análisis Instrumental de los Alimentos



Héctor Zumbado Fernández

ANÁLISIS Instrumental DE LOS ALIMENTOS

HÉCTOR ZUMBADO FERNÁNDEZ

Editorial Universitaria
Ministerio de Educación Superior
La Habana, 2021

ANÁLISIS Instrumental DE LOS ALIMENTOS

543-Z948 2021

Zumbado Fernández, Héctor

Análisis instrumental de los alimentos / Héctor Zumbado Fernández, autor, edición y diseño de la cubierta. – La Habana : Editorial Universitaria (Cuba), febrero 2021. – ISBN 978-959-16-4542-5 (PDF interactivo, 16 Mb). – (xvi, 496 páginas): tablas, ilustraciones y apéndices. – 8,27 por 11,69 pulgadas.

1. Química Analítica; 2. Alimentos; 3. Educación Superior; 4. EcuLibro.
I. Título.

El libro: *Análisis instrumental de los alimentos* ha sido evaluado por expertos de reconocido prestigio internacional y ha sido avalado para su publicación y utilización en el proceso de enseñanza-aprendizaje de las universidades adscritas al Ministerio de Educación Superior de la República de Cuba. El libro es una versión actualizada de la obra: *Análisis instrumental de los alimentos* / Héctor Zumbado Fernández. – Editorial Félix Varela, 2015. – ISBN 978-959-2035-2, la cual recibió, en 2016, el Premio de la Crítica Científico-Técnica, otorgado por el Instituto Cubano del Libro.

Editorial Universitaria. Calle 23 esquina a F. núm. 565. El Vedado, La Habana, portal web http://eduniv.reduniv.edu.cu

Sección de Editores de la SOCICT Cuba 460, e/ Teniente Rey y Amargura, La Habana Vieja, portal web http://socict.org.cu

Disponible en la Plataforma digital EdUniv-SOCICT
http://catalogo.reduniv.edu.cu

Libro protegido con DRM social: se permite descargar y compartir el libro con otros, siempre y cuando se de crédito a su autor, no se modifique el contenido de forma alguna, ni se comercialice sin la autorización del autor.

Avalado por Editorial Universitaria para su publicación en eLibro.com
http://www.elibro.com/acerca/

Avalado por la SOCICT como fuente confiable para la escritura de artículos en la EcuRed
https://www.ecured.cu/EcuLibro

Héctor Manuel Zumbado Fernández (1962-). Cubano. Doctor en Ciencias Pedagógicas (2005), Master en Ciencias de la Educación Superior (1999) y Master en Ciencia y Tecnología de los Alimentos (1998). Licenciado en Alimentos (1985).

Ha impartido docencia en pregrado y postgrado en temáticas de Análisis de los Alimentos, Química de los Alimentos, Metodología de la Investigación Científica, Didáctica Universitaria y Comunicación Educativa, entre otras. Ha realizado investigaciones en el campo de las ciencias alimentarias y en el área educativa.

De estos temas se han derivado más de 40 publicaciones en revistas nacionales e internacionales, así como en Memorias de eventos científicos. Autor de 5 libros de texto.

Trabajó como docente e investigador durante 33 años en el Instituto de Farmacia y Alimentos de la Universidad de La Habana, fungiendo como miembro del Comité Académico y del Tribunal Nacional del Doctorado en Ciencias de los Alimentos. Premio Anual de la Academia de Ciencias de Cuba (2002); ostenta la Distinción por la Educación Cubana y la Medalla Rafael María de Mendive. En la actualidad labora como docente en la Universidad Técnica de Manabí, Portoviejo, Ecuador.

Email: hzumbadof@gmail.com

ndice de contenidos

Prefacio /1

Capítulo 1. Introducción al Análisis Instrumental de los Alimentos /4

1.1. El análisis de los alimentos /4

1.1.1. Principales campos de aplicación de la química analítica en el área de los alimentos /5

1.2. Química analítica. Definición y clasificación de los métodos de análisis /9

1.3. Metodología analítica /10

1.3.1. Determinación de los objetivos analíticos /12

1.3.2. Selección del método analítico /13

1.3.3. Muestreo y toma de la muestra /14

1.3.4. Preparación de la muestra /16

1.3.5. Procedimiento de determinación /20

1.3.6. Cálculos e interpretación de los resultados /21

1.4. Los métodos instrumentales de análisis de los alimentos /21

1.4.1. Tipos de métodos instrumentales /22

1.4.2. Instrumentos para el análisis /24

1.4.3. Parámetros de calidad de los métodos e instrumentos /25

1.4.3.1. Precisión /26

1.4.3.2. Veracidad o justeza /28

1.4.3.3. Linealidad /31

1.4.3.4. Sensibilidad /33

1.4.3.5. Límite de detección /34

1.4.3.6. Límite de cuantificación /34

1.4.3.7. Intervalo de concentración /35

1.4.3.8. Selectividad /36

Trabajo independiente /37

Bibliografía /37

Capítulo 2. Introducción a los métodos ópticos /39

2.1. Características de la radiación electromagnética /39

2.2. Espectro electromagnético /42

2.3. Interacción de radiación electromagnética con la materia /43

2.3.1. Absorción de radiación electromagnética /43

2.3.1.1. Espectros de absorción /44
2.3.1.2. Absorción atómica /45
2.3.1.3. Absorción molecular /45
2.3.2. Emisión de radiación electromagnética /48
2.3.3. Refracción de radiación electromagnética /49
2.3.4. Polarización de radiación electromagnética /51
2.4. Clasificación de los métodos ópticos /53
Bibliografía /53

Capítulo 3. Espectrometría de absorción molecular ultravioleta y visible /55

3.1. Regiones del espectro Ultravioleta-Visible /55
3.2. Características de los espectros de absorción en la región UV-Visible /56
3.3. Leyes que rigen la absorción /57
3.3.1. Desviaciones de la Ley de Lambert-Beer /60
3.4. Especies absorbentes /61
3.4.1. Especies químicas absorbentes que contienen electrones π, σ y n /62
3.4.2. Absorción por transferencia de carga /67
3.5. Instrumentos de medición /68
3.5.1. Fuentes de radiación /69
3.5.2. Selector de longitud de onda /70
3.5.3. Recipientes para muestras /71
3.5.4. Detectores /72
3.5.5. Registro y procesamiento de datos /73
3.6. Aplicaciones cualitativas de la espectrometría de absorción UV-visible /73
3.7. Aplicaciones cuantitativas de la espectrometría UV-visible /74
3.7.1. Establecimiento de las condiciones de trabajo /75
3.7.1.1. Elección de la longitud de onda de trabajo /75
3.7.1.2. Reacciones de derivatización a considerar /76
3.7.1.3. Variables que influyen en la absorbancia /77
3.7.1.4. El ensayo en blanco /77
3.7.2. Métodos de cuantificación /77
3.7.2.1. Método del patrón externo /78
3.7.2.2. Curva de calibración /79
3.8. Aplicaciones en el análisis de los alimentos /85
Trabajo independiente /88
Bibliografía /88

Capítulo 4. Espectrometría de absorción atómica /89

4.1. Principios generales de la espectrometría de absorción atómica /90

4.2. Técnicas de atomización de la muestra /92

4.2.1. Atomización con llama /92

4.2.2. Atomización electrotérmica /96

4.3. Fuentes de radiación /99

4.4. Interferencias en espectroscopia de absorción atómica /101

4.4.1. Interferencias espectrales /101

4.4.2. Interferencias químicas /102

4.5. Técnicas analíticas de absorción atómica /105

4.5.1. Preparación de la muestra /105

4.5.2. Análisis cualitativo /106

4.5.3. Análisis cuantitativo /107

4.6. Aplicaciones de la espectrometría de absorción atómica /110

4.6.1. Aplicaciones en el análisis de los alimentos /111

Trabajo independiente /113

Bibliografía / 113

Capítulo 5. Espectrometría de emisión atómica /115

5.1. Principios generales de la espectrometría de emisión atómica /115

5.2. Espectroscopia de emisión con fuentes de plasma /118

5.2.1. La fuente de plasma de acoplamiento inductivo /119

5.2.2. La fuente de plasma de corriente continua / 122

5.2.3. Aplicaciones de las fuentes de plasma /123

5.3. Espectroscopia de emisión con fuentes de arco y chispa /126

5.3.1. Espectroscopia de emisión con fuente de arco /127

5.3.2. Fuentes de chispa y espectros de chispa /129

5.4. Fuentes de emisión de llama /130

Trabajo independiente /131

Bibliografía /131

Capítulo 6. Espectrometría de fluorescencia molecular /132

6.1. Teoría de la fluorescencia /132

6.1.1. Diagrama de niveles de energía para las moléculas fluorescentes /132

6.1.2. Procesos de desactivación /133

6.2. Variables que afectan a la fluorescencia /136

6.2.1. Rendimiento cuántico /136

6.2.2. Tipos de transiciones en fluorescencia /137
6.2.3. Eficacia cuántica y tipo de transición /137
6.2.4. Fluorescencia y estructura /138
6.2.5. Efecto de la rigidez estructural /139
6.2.6. Efectos de la temperatura y del disolvente /140
6.2.7. Efecto del pH en la fluorescencia /140
6.2.8. Efecto del oxígeno disuelto /141
6.2.9. Efecto de la concentración en la intensidad de fluorescencia /141
6.3. Instrumentos para la medida de la fluorescencia /142
6.3.1. Componentes de los fluorómetros y de los espectrofluorímetros /143
6.4. Aplicaciones de los métodos fluorescentes /144
Trabajo independiente /146
Bibliografía /146

Capítulo 7. Refractometría y polarimetría /147

7.1. Refractometría /147
7.1.1. Variables que afectan las mediciones del índice de refracción /147
7.1.2. Instrumentos para medir el índice de refracción /148
7.1.2.1. Refractómetros óptico-mecánicos /149
7.1.2.2. Refractómetros automáticos digitales /153
7.1.3. Aplicaciones de la refractometría /154
7.2. Polarimetría /158
7.2.1. Variables que afectan la rotación óptica /159
7.2.2. Polarímetros /160
7.2.2.1. Sacarímetros /164
7.2.2.2. Polarímetros automáticos / 164
7.2.3. Aplicaciones de la polarimetría /166
Trabajo independiente /168
Bibliografía /168

Capítulo 8. Introducción a los métodos cromatográficos /169

8.1. Generalidades /169
8.2. Clasificación de los métodos cromatográficos /171
8.3. Mecanismos de separación cromatográfica /173
8.3.1. Cromatografía de adsorción /173
8.3.2. Cromatografía de reparto /175
8.3.3. Cromatografía de intercambio iónico /177

8.3.4. Cromatografía de filtración sobre gel /181
Trabajo independiente /184
Bibliografía /184

Capítulo 9. Cromatografía en columna /185
9.1. Generalidades /185
9.2. Etapas de trabajo de la cromatografía líquida en columna convencional /186
9.2.1. Selección y preparación de la fase móvil y la fase estacionaria /186
9.2.2. Aplicación de la muestra /188
9.2.3. Corrida cromatográfica y elución de los componentes /188
9.2.4. Recogida de los eluatos y detección de los componentes /190
9.2.5. Identificación y cuantificación de los compuestos separados /192
9.3. Eficiencia de una columna cromatográfica /193
9.3.1. Teorías de la elución cromatográfica /195
9.3.1.1. Teoría de los platos teóricos /196
9.3.1.2. Teoría cinética /197
9.3.2. Otros parámetros cromatográficos de interés /202
Trabajo independiente /205
Bibliografía /205

Capítulo 10. Cromatografía líquida de alta resolución /206
10.1. Generalidades /206
10.2. Descripción del proceso cromatográfico /207
10.3. Los componentes del sistema cromatográfico /208
10.3.1. La fase móvil /209
10.3.2. La bomba /212
10.3.3. Sistema de inyección o válvula de introducción de muestras /214
10.3.4. La precolumna /216
10.3.5. La columna cromatográfica /216
10.3.5.1. Características generales /216
10.3.5.2. La fase estacionaria /219
10.3.5.3. Los mecanismos de separación en HPLC /222
10.3.5.4. Especificaciones de las columnas cromatográficas /230
10.3.5.5. Problemas de la columna cromatográfica /231
10.3.6. Los detectores /233
10.3.6.1. Detectores espectrofotométricos UV-Vis /233
10.3.6.2. Detector refractométrico /234

10.3.6.3. Detector de fluorescencia /235
10.3.6.4. Detector electroquímico /235
10.3.6.5. Detector de conductividad /237
10.3.6.6. Otros detectores usados en HPLC /237
10.3.6.7. Acople de la HPLC con espectrometría de masas /238
10.3.7. Sistema de registro y procesamiento de la información cromatográfica /243
10.3.8. El colector de fracciones /244
10.4. Modos de operación en HPLC /245
10.4.1. Régimen isocrático /245
10.4.2. Programación de la composición de la fase móvil /246
10.4.2.1. La Elección de los Solventes A y B /247
10.4.2.2. Tipos de gradiente /247
10.4.3. Programación de flujo o presión de la fase móvil /249
10.4.4. Programación de temperatura /250
10.5. Tratamiento de muestras para HPLC /250
10.5.1. Extracción en fase sólida /251
10.5.2. Microextracción en fase sólida /252
10.6. Aplicaciones analíticas de HPLC /254
10.6.1. Análisis cualitativo /255
10.6.1.1. Comparación de los tiempos de retención /256
10.6.1.2. Anchura en la altura media /256
10.6.1.3. Enriquecimiento de pico /257
10.6.1.4. Utilización de un detector con arreglo de diodos /257
10.6.1.5. Acoplamiento en línea de HPLC con técnicas espectroscópicas /258
10.6.1.6. Colección de analitos eluidos e identificación por técnicas espectroscópicas, de microanálisis y por cromatografía de capa delgada /258
10.6.2. Análisis cuantitativo /259
10.6.2.1. Método de la curva de calibración /262
10.6.2.2. Método del patrón externo /262
10.6.2.3. Método del patrón interno /264
10.6.2.4. Método de normalización interna /269
10.6.3. Límite de detección y límite de cuantificación /270
10.7. HPLC preparativa /271
10.7.1. La fase móvil /272

10.7.2. Solubilidad de la muestra en la fase móvil /272

10.7.3. Importancia relativa del número de platos teóricos y el factor de selectividad /273

10.7.4. La masa de la muestra a inyectar /273

10.7.5. Rendimiento /273

10.7.6. Alcance y requerimientos materiales de la HPLC preparativa /274

Trabajo independiente /275

Bibliografía /275

Capítulo 11. Cromatografía de gases /278

11.1. Generalidades /278

11.2. Descripción del proceso cromatográfico /278

11.3. El cromatógrafo de gases /280

11.3.1. Los gases /280

11.3.2. Prefiltros /282

11.3.3. Control de flujo. Manoreductor /283

11.3.4. La cámara de inyección /283

11.3.4.1. La cámara de inyección para columnas empacadas /285

11.3.4.2. El inyector y los métodos de inyección para columnas capilares /287

11.3.5. La columna cromatográfica /290

11.3.5.1. Columnas empacadas /291

11.3.5.2. Columnas capilares /297

11.3.6. El horno /301

11.3.6.1. Cromatografía a temperatura programada /302

11.3.7. El detector /305

11.3.7.1. Características fundamentales de los detectores /305

11.3.7.2. Descripción del principio y aplicaciones de algunos detectores de gran uso /308

11.3.7.2.1. Detectores de conductividad térmica /308

11.3.7.2.2. Detector de ionización por llama /310

11.3.7.2.3. Detector de captura electrónica /312

11.3.7.2.4. Detector termoiónico /315

11.3.7.2.5. Detector fotométrico de llama /316

11.3.7.2.6. Acoplamiento GC-MS /318

11.3.8. Amplificador /320

11.3.9. Registrador /320

11.4. Tratamiento de muestras en cromatografía de gases /321

11.4.1. Derivatización /321
11.4.2. Técnicas empleadas para la extracción de componentes volátiles /323
11.4.2.1. Microextracción en fase sólida /324
11.5. Aplicaciones analíticas de la cromatografía de gases /327
11.5.1. Uso de columnas de diferente polaridad /328
11.5.2. Utilización de varios detectores /328
11.5.3. Partición seguida de cromatografía gaseosa /329
11.5.4. Transesterificacion /329
11.5.5. Desplazamiento de un pico por modificación química /329
Trabajo independiente /330
Bibliografía /330

Capítulo 12. Cromatografía en capa delgada /333

12.1. Generalidades /334
12.2. Naturaleza del proceso cromatográfico /337
12.3. Placas cromatográficas /338
12.4. Aplicación de la muestra /341
12.5. Técnicas de desarrollo de los cromatogramas /343
12.6. Técnicas de revelado /349
12.6.1. Revelado físico /349
12.6.2. Revelado químico /349
12.7. Análisis cualitativo /351
12.8. Análisis cuantitativo /353
12.8.1. Método de elución de los componentes /353
12.8.2. Métodos densitométricos /354
Trabajo independiente /357
Bibliografía /358

Capítulo 13. Métodos potenciométricos /359

13.1. Principios generales de los métodos potenciométricos /359
13.2. Electrodos de referencia /362
13.2.1. Electrodos de Calomel /363
13.2.2. Electrodos de plata/cloruro de plata /364
13.3. Electrodos indicadores /364
13.3.1. Electrodos indicadores metálicos /365
13.3.2. Electrodos indicadores de membrana /367
13.4. Aplicaciones de los métodos potenciométricos /370

13.4.1. Métodos potenciométricos directos /371

13.4.2. Métodos potenciométricos indirectos /372

13.4.3. Preparación de muestras y límites de detección /375

13.4.4. Aplicaciones de los métodos potenciométricos en el análisis de los alimentos /375

Trabajo independiente /377

Bibliografía /378

Capítulo 14. Ejercicios y problemas /379

14.1. Ejercicios propuestos /379

14.2. Problemas integradores /403

14.3. Análisis de documentación científica /413

Capítulo 15. Aplicaciones de los métodos instrumentales en la investigación científica /417

15.1. Determinación de polisacáridos totales en gel líquido de Aloe Vera L, para su empleo como materia prima en formulaciones de suplementos dietéticos /420

15.2. Leche fluida y yogur natural enriquecidos con hierro /424

15.3. Desinfestación del frijol de soja por irradiación /432

15.4. Caracterización analítica de alginato de sodio /437

15.5. Validación de un método para la determinación de patulina en jugos y purés de frutas por HPLC /447

15.6. Carotenoides séricos y su relación con la dieta en un grupo de adultos cubanos /453

15.7. Ocurrencia de aflatoxina M_1 en leches cruda, ultrapasteurizada y orgánica producidas y comercializadas en el altiplano mexicano /463

15.8. Análisis de los compuestos volátiles del tomate de árbol (*Cyphomandra betacea Sendtn*.) mediante microextracción en fase sólida /473

15.9. Método de microextracción en fase sólida para el análisis de compuestos volátiles en cervezas /479

15.10. Validación de un método por cromatografía de gases para la determinación de los ácidos grasos que componen el D-004 ingrediente activo /486

Apéndices

Apéndice A. Resumen de los aspectos generales del análisis de los alimentos

A-1. Lugar y papel del análisis de los alimentos en las Ciencias Alimentarias

A-2. Metodología analítica

A-3. Algunos procedimientos de preparación de la muestra

A-4. Criterios de calidad de los instrumentos y métodos de análisis

Apéndice B. Resumen de los métodos ópticos

B-1. Resumen gráfico de los métodos de absorción

B-2. Resumen gráfico de los métodos de emisión

B-3. Procedimientos más usuales para el tratamiento de muestras en los métodos ópticos estudiados

B-4. Características de los instrumentos empleados en los métodos ópticos estudiados

B-5. Resumen de los procedimientos de cuantificación empleados en los métodos ópticos estudiados

B-6. Parámetros estadísticos a considerar para verificar el ajuste del modelo a los resultados experimentales en los procedimientos analíticos de curva de calibración, adición de patrón y patrón interno

B-7. Resumen gráfico de los métodos refractométricos y polarimétricos

Apéndice C. Resumen de los métodos cromatográficos

C-1. Resumen gráfico de la clasificación de los métodos cromatográficos

C-2. Mecanismos de separación en cromatografía

C-3. Eficiencia de una columna cromatográfica

C-4. Principios de funcionamiento de los métodos cromatográficos estudiados

C-5. Instrumentación empleada en cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

C-6. Instrumentación empleada en cromatografía de gases (GLC)

C-7. Procedimientos de identificación empleados en HPLC y Cromatografía de gases

C-8. Procedimientos de cuantificación empleados en HPLC y Cromatografía de gases

C-9. Procedimientos de identificación y cuantificación empleados cromatografía en capa delgada (CCD)

C-10. Comparación entre la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y la cromatografía de gases (GLC)

Apéndice D. Resumen de los métodos potenciométricos

D-1. Principios y electrodos

D-2. Aplicaciones de los métodos potenciométricos

Prefacio

La Ciencia dispone hoy en día de una serie impresionante de poderosas y selectivas herramientas instrumentales para obtener información cualitativa y cuantitativa acerca de la composición y estructura de la materia. A estos métodos modernos, que emplean instrumentos de medición con mayor o menor grado de sofisticación, para la separación y determinación de especies químicas en matrices generalmente complejas, se les conoce, en conjunto, como *métodos instrumentales de análisis*.

Sin embargo, la correcta elección y el buen uso de los métodos modernos de análisis instrumental, requiere la comprensión de los principios fundamentales en los que se basan estos sistemas de medida. Sólo así se puede elegir de forma adecuada entre las distintas alternativas para resolver un problema analítico, y sólo así se podrán valorar las dificultades inherentes a las medidas físicas y establecer un criterio respecto a las limitaciones de las medidas instrumentales en cuanto a la sensibilidad, precisión y exactitud.

Este libro va dirigido especialmente a los profesionales y estudiantes de las Ciencias Alimentarias. Los textos básicos que tradicionalmente se han utilizado para el estudio del Análisis Instrumental, si bien han tenido un adecuado nivel científico técnico, han carecido de un enfoque analítico dirigido al campo de los alimentos, lo cual ha conspirado contra el necesario estudio independiente que garantice una adecuada profundización de los contenidos en una enseñanza de nivel superior.

Si bien el análisis instrumental incluye un gran número de métodos, no todos aparecen en este libro, sino solo aquellos de mayor y más frecuente aplicación en matrices alimentarias. Así por ejemplo, técnicas espectroscópicas tan poderosas desde el punto de vista cualitativo como la espectroscopia infrarroja, la espectrometría de masas y la espectroscopia de resonancia magnética nuclear no se incluyen en este texto porque su empleo en el análisis de los alimentos es muy poco frecuente. Lo mismo ocurre con los métodos electroanalíticos de electrogravimetría, polarografía, conductimetría, amperometría y voltametría, los cuales tampoco aparecen referidos por las mismas razones.

Con esta idea, el objetivo de este texto es proporcionar al profesional de las Ciencias Alimentarias una introducción a los principios de los métodos de análisis espectrométricos, cromatográficos y potenciométricos[1].

[1] Debe señalarse que los contenidos incluidos en este libro pueden ser también útiles para profesionales y estudiantes de las áreas de Ciencias biológicas, Química, Ciencias de la salud, Ingeniería y Ciencias medioambientales, entre otras.

En el *Capítulo 1* se abordan los principios generales del análisis instrumental, aplicado al campo de las ciencias alimentarias revelándose su importancia y los principales campos de aplicación de los métodos instrumentales en la evaluación de los alimentos. Especial interés revisten los epígrafes relacionados con el esquema de un análisis completo a los cuales se debe prestar una particular atención dado que constituyen el hilo conductor de cualquier procedimiento analítico dirigido a la determinación de un componente en un alimento. Cualquiera que sea el método de análisis químico aplicado a una materia prima o producto terminado, con independencia de los fundamentos teóricos que sustenten estos métodos (volumétricos, gravimétricos, ópticos, cromatográficos, electroanalíticos, etc), será obligado transitar de alguna u otra forma por las etapas que integran este esquema general de trabajo y expresar finalmente los resultados como una forma de concentración.

Los fundamentos básicos de los métodos ópticos se explican en el primero de los cuatro capítulos dedicados ellos (*Capítulo 2*). Le siguen capítulos más detallados sobre espectrometría de absorción molecular UV-Vis (*Capítulo 3*), espectrometría de absorción y emisión atómica (*Capítulos 4 y 5*) y espectrometría de fluorescencia molecular (*Capítulo 6*). El *Capítulo 7* se dedica al estudio de la refractometría y la polarimetría que, aunque de menor empleo que los anteriores presentan algunas aplicaciones de interés en el análisis de los alimentos. La información que aparece en estos capítulos incluye los principios generales, los componentes instrumentales y las aplicaciones cualitativas y cuantitativas de estos métodos.

El *Capítulo 8*, constituye el primero de una serie de cinco, dedicados a las separaciones cromatográficas, donde se expone los fundamentos generales de estos importantísimos métodos de análisis. Los cuatro restantes se dedican al estudio particular de la cromatografía en columna clásica (*Capítulo 9*), la cromatografía líquida de alta resolución (*Capítulo 10*), la cromatografía de gases (*Capítulo 11*) y la cromatografía en capa delgada (*Capítulo 12*).

El último de los capítulos del cuerpo teórico del libro se centra en el estudio de los métodos potenciométricos (*Capítulo 13*) el cual es el único de los procedimientos electroanalíticos que se tratan en este texto por las razones antes expuestas.

El *Capítulo 14* (Ejercicios y problemas) incluye 19 ejercicios y 4 problemas integradores elaborados especialmente para este texto con vistas a facilitar la necesaria ejercitación que requiere una disciplina de este tipo. Se presenta también en este capítulo un epígrafe especial dedicado al análisis de documentación científica cuyo objetivo es el estudio e interpretación de algunos artículos científicos que aparecen en el capítulo 15.

Finalmente se presenta el *Capítulo 15 (Aplicaciones de los métodos instrumentales en la investigación científica)* en el cual aparecen de forma íntegra 10 artículos científicos publicados en revistas nacionales e internacionales

entre los años 1995 y 2010, donde se evidencia la aplicación concreta de los elementos teóricos y prácticos contenidos en el texto, en la resolución de problemáticas actuales en el campo de los alimentos y donde se pone de manifiesto el carácter multidisciplinario de la ciencia, puesto que se integran elementos de diferentes asignaturas y disciplinas que ya ha recibido, está recibiendo o incluso recibirá el estudiante de la especialidad de Ciencias Alimentarias (Análisis Químico, Química de los Alimentos, Bioestadística, Evaluación Sensorial, Toxicología y Nutrición, entre otras).

Se incluyen también en este texto cuatro apéndices, a modo de resúmenes de los aspectos más importantes de los métodos abordados, presentados en forma de esquemas y tablas principalmente.

Es importante señalar que al finalizar los capítulos teóricos (con excepción del capítulo 2), se orienta un estudio independiente consistente por lo general en la resolución de determinados ejercicios y problemas incluidos en el Capítulo 14. También pueden encontrarse orientaciones para resolver tareas docentes relacionadas con el estudio y análisis de los artículos científicos que aparecen en el Capítulo 15 o consultar algunos de los resúmenes que aparecen en el apartado Apéndices.

En este sentido, insistimos en la importancia de realizar el trabajo independiente, justo en el momento en que se orienta, pues es precisamente inmediatamente después de estudiar un contenido que se está en mejores condiciones para ejercitar los conceptos estudiados.

Escribir este libro constituyó una tarea laboriosa y compleja, que requirió muchos meses de profundo estudio, reflexión, búsqueda de información y consultas con especialistas. Entre la bibliografía consultada cabe destacar los textos Principios de Análisis Instrumental, de Skoog, D; Holler, F y Nieman, T. (2001) y la obra Métodos cromatográficos, de Dierksmeier, G. (2005), en las que encontré valiosas informaciones que contribuyeron de forma significativa al diseño de esta obra.

Esperamos que esta obra les sea útil a profesionales y estudiantes del campo de la química analítica instrumental, particularmente a aquellos que se desempeñan en el fascinante mundo de los alimentos. Agradecemos por anticipado sus opiniones y sugerencias sobre la forma y contenido de este libro. Ustedes, los lectores, tendrán la última palabra.

El autor

1 Introducción al Análisis Instrumental de los Alimentos

1.1. El análisis de los alimentos

La importancia de la alimentación como necesidad vital es un hecho incuestionable conocido por todos. Si bien es importante comprender esta verdad, también es necesario conocer como nos alimentamos, es decir cuál es la calidad de los alimentos que ingerimos, sobre todo por la gran relación que se ha demostrado que tiene la alimentación con la salud. La alimentación por ser un acto reiterado, a largo plazo y vital, constituye el factor ambiental que más influye en la etiología, es decir la causa, de numerosas enfermedades como el cáncer, la obesidad, la ateroesclerosis, etc.

Los alimentos no son compuestos estáticos, sino dinámicos y consecuentemente las ciencias alimentarias deben estudiar la composición de los alimentos y los efectos que sus componentes provocan en el curso de los diferentes procesos a que están sujetos los alimentos, investigando y descubriendo las conexiones que existen entre la estructura de los diferentes compuestos y sus propiedades organolépticas así como su capacidad de deterioro en función de su composición química.

La caracterización de los alimentos proviene de los resultados de los diferentes ensayos a que puede sometérseles utilizando diferentes métodos de evaluación, los cuales pueden agruparse en función de los objetivos que persigan y los principios en que se fundamentan. Así, la evaluación de los alimentos involucra tres tipos de análisis: análisis físico-químico, análisis microbiológico y análisis sensorial.

Análisis físico-químico: Implica la caracterización de los alimentos desde el punto de vista físico-químico, haciendo énfasis en la determinación de su composición química, es decir, cuales sustancias están presentes en un alimento (proteínas, grasas, vitaminas, minerales, hidratos de carbono, contaminantes metálicos, residuos de plaguicidas, toxinas, antioxidantes, etc.) y en qué cantidades estos compuestos se encuentran. El análisis físico-químico brinda poderosas herramientas que permiten caracterizar un alimento desde el punto de vista nutricional y toxicológico, y constituye una disciplina científica de enorme impacto en el desarrollo de otras ciencias como la bioquímica, la medicina y las ciencias farmacéuticas, por solo mencionar algunas.

Análisis microbiológico: Los alimentos son sistemas complejos de gran riqueza nutritiva y por tanto, sensibles al ataque y posterior desarrollo de microorganismos (bacterias, hongos y levaduras). En todos los alimentos hay

siempre una determinada carga microbiana, pero esta debe ser controlada y no debe sobrepasar ciertos límites, a partir de los cuales comienza a producirse el deterioro del producto con la consecuente pérdida de su calidad y aptitud para el consumo. Por otra parte, existen microorganismos patógenos que producen enfermedades y cuya presencia es por tanto indeseable y hace extraordinariamente peligroso su consumo. El análisis microbiológico se realiza entonces con vistas a identificar y cuantificar los microorganismos presentes en un producto, así como también constituye una poderosa herramienta en la determinación de la calidad higiénico-sanitaria de un proceso de elaboración de alimentos, lo que permite identificar aquellas etapas del proceso que puedan favorecer la contaminación del producto.

Análisis sensorial: Constituye una disciplina científica que permite evaluar, medir, analizar e interpretar las características sensoriales de un alimento (color, olor, sabor y textura) mediante uno o más órganos de los sentidos humanos. A pesar de que la evaluación sensorial es el análisis más subjetivo, pues el instrumento de medición es el ser humano, muchas veces define el grado de aceptación o rechazo de un producto. Está claro que un alimento que no resulte grato al paladar, a la vista o al olfato, no será aceptado, aunque contenga todos los constituyentes nutritivos necesarios y esté apto desde el punto de vista microbiológico.

Debe tenerse muy presente que ninguno de los métodos señalados tiene mayor o menor importancia que los otros y todos desempeñan un gran papel en la determinación del valor de los alimentos. Solo la aplicación articulada y consecuente de los métodos físico-químicos, microbiológicos y sensoriales puede ofrecer evidencia objetiva de la calidad integral de un alimento.

Los contenidos que se presentan en este texto, estarán centrados en el estudio de los métodos instrumentales de análisis. De ahí, que a continuación reseñaremos brevemente cuales son los principales campos de aplicación de estos métodos en las ciencias alimentarias, de los cuales se deriva su incuestionable importancia.

1.1.1. Principales campos de aplicación de la química analítica en el área de los alimentos.

1. Control de la calidad.

La norma ISO 9000 define el término "calidad" como el conjunto de propiedades y características de un producto o servicio que le confieren su actitud para satisfacer necesidades al consumidor.

Hoy en día, ningún producto sale al mercado sin antes ser sometido a un riguroso control de calidad que garantice su aceptación para ser comercializado. En los alimentos el control de calidad constituye una etapa más del proceso productivo y adquiere una particular importancia por la relación existente entre la alimentación y la salud. Por otra parte, el control de calidad en la industria de los alimentos permite encontrar las fallas y los errores en el proceso de fabricación y en lo que respecta a las materias

primas, almacenamiento, transportación, etc., proponiendo medidas eficaces para disminuir o eliminar estos errores.

Las determinaciones físico-químicas que se realizan a los alimentos como parte del control de calidad, así como los límites en que deben encontrarse los componentes que se cuantifican están normadas en documentos técnicos y dependen del tipo de alimento.

A modo de ejemplo, se relacionan a continuación las especificaciones de calidad que deben cumplir algunos productos alimenticios elaborados (tabla 1.1).

Tabla 1.1. Indicadores físico químicos generales por grupo de alimentos.

Grupos de alimentos	Indicadores generales	Indicadores específicos
Leche y derivados	pH, Acidez, Grasa, Proteína, Caracteres organolépticos.	• Humedad (Leche en polvo y quesos) • Sólidos totales (Helado, leche pasteurizada, yogurt) • Densidad (leche fluida) • Cloruros (Quesos)
Productos Cárnicos	pH, Acidez, Grasa, Proteína, Cloruros	• Humedad (Embutidos)
Pescados, mariscos y productos de la pesca.	pH, Acidez, Cloruros, Grasa, Proteínas, Caracteres organolépticos.	• Peróxidos (conservas en aceite) • Humedad (Embutidos)
Bebidas alcohólicas	Acidez total, Grado alcohólico	• Densidad (Vinos) • Acidez Volátil (Vinos) • Sólidos solubles (Licores, cervezas) • CO_2 (Cervezas)
Bebidas no alcohólicas (incluye vinagres)	Acidez, pH	• CO_2 (Refrescos carbonatados, Maltas)
Cereales, granos y especies secas	Humedad	• Cenizas (Harinas, Especias) • Acidez (Harinas)
Grasas y Aceites comestibles (incluye Mayonesa)	Acidez, Índice de Peróxido, Índice de Yodo, Ácidos grasos, Caracteres organolépticos, Kreiss	• Punto de Fusión (Margarinas) • Contenido de grasa total (Mayonesa)
Frutas y Vegetales	pH, Acidez	• Sólidos Solubles (Conservas de tomate, Néctares, Frutas y Vegetales en almíbar) • Cloruros (Conservas de Vegetales)
Caldos y sopas deshidratadas, sal, azúcares y polvos en general (incluye café)	Humedad	• Cenizas (Caldos y sopas) • Sólidos insolubles (Sal)

Grupos de alimentos	Indicadores generales	Indicadores específicos
Confituras (Chocolates, Caramelos, gelatinas)	Humedad	
Pastas alimenticias y galletas en general	Humedad	
Salsas condimentadas y aderezos	pH, Acidez	• Cloruros (Salsa de soya) • Índice de peróxido (salsas a base de grasa)

El control de calidad no se circunscribe solo al producto final, sino que también deben controlarse rigurosamente la materia prima y el producto durante el propio proceso de elaboración. Así, por ejemplo, en la fabricación de yogurt, la leche que se emplea como materia prima debe poseer determinados niveles de acidez, proteínas y grasas que son necesarios controlar. Luego durante el proceso de elaboración es indispensable determinar el % de acidez expresado como ácido láctico, puesto que niveles entre 0.6 y 0.8 % indican el momento de detener la fermentación.

Debe señalarse que si bien se ha hecho énfasis en el control físico-químico existen parámetros microbiológicos y sensoriales que igualmente son determinados como parte del control de calidad.

2. Estudios de almacenamiento y conservación.

Durante la etapa de almacenamiento, los alimentos pueden sufrir transformaciones que involucren cambios en su composición química con la consecuente aparición de productos indeseables que afectan su conservación y por ende su aptitud para el consumo. Así, la efectividad de un nuevo envase o método de conservación y/o almacenamiento, puede ser evaluada a través de la determinación cualitativa o cuantitativa de ciertas sustancias. Por ejemplo, la presencia de peróxidos en los aceites y grasas comestibles, es indicativo de la ocurrencia de procesos oxidativos en los lípidos que imposibilitan su consumo. Por otra parte, el incremento del contenido de azúcares reductores en mermeladas y compotas puede ser resultado de procesos hidrolíticos que sufre el almidón por acción de enzimas secretadas por microorganismos. En ambos casos, las determinaciones de estos componentes (peróxidos y azúcares reductores) se realiza usando métodos físico-químicos y constituyen una medida de la estabilidad del producto, bajo las condiciones de conservación y almacenamiento.

Debe señalarse que algunos estudios de almacenamiento se realizan como parte del control de calidad. Otros sin embargo se integran en el campo de la investigación.

3. Estudios nutricionales y toxicológicos.

El valor nutricional de un alimento depende obviamente de su composición química y está asociado no solo a la cantidad de nutrimentos que posea sino también y sobre todo a la calidad de estos nutrimentos. No basta con conocer la cantidad de proteínas o grasas presentes en un alimento sino que también es necesario conocer como estos se metabolizan y la incidencia que los mismos tienen en la salud. Mediante los métodos instrumentales es posible no solo determinar la cantidad de proteínas o grasas de un alimento sino también la composición de aminoácidos que poseen las proteínas y la proporción de ácidos grasos presentes en los lípidos.

Por otra parte, la calidad de un alimento depende también de su inocuidad, es decir de la ausencia de ciertas sustancias que pueden resultar tóxicas y por tanto dañinas al organismo. Estas sustancias son de naturaleza muy variada y pueden contaminar los alimentos durante los procesos tecnológicos de elaboración o ser parte de una contaminación ambiental del producto (contaminación metálica con los envases o durante el proceso productivo, presencia de aflatoxinas como resultado de una contaminación fúngica, presencia de residuos de plaguicidas, etc.). Otras sustancias tóxicas son componentes naturales en los alimentos (glicósidos cianogénicos, alcaloides, aminas biógenas, etc.) o se forman como resultado de procesos fermentativos por microorganismos (formación de metanol, alcoholes superiores, etc.). También existen sustancias denominadas aditivos, que se añaden intencionalmente dado que cumplen alguna función en el proceso de elaboración (preservantes, colorantes, saborizantes, espesantes, estabilizadores, etc.) y algunas de ellas poseen efectos tóxicos si se sobrepasan determinados niveles, por lo que su presencia debe ser rigurosamente controlada.

Resulta entonces extraordinariamente importante realizar estudios dirigidos a evaluar el estado toxicológico de un alimento. En este sentido debe destacarse que una enorme cantidad de sustancias tóxicas pueden ser analizadas cualitativa y cuantitativamente empleando métodos instrumentales de análisis.

4. Estudios de nuevas fuentes de alimentación no convencionales y productos para regímenes especiales.

La búsqueda de nuevas fuentes de alimentación no convencionales (salvado de arroz, frijol de soya, espirulina, etc.), así como la formulación de nuevos productos utilizando estas fuentes es un objetivo esencial de la investigación actual, que requiere la aplicación de numerosos métodos de análisis químico con vistas a caracterizar nutricionalmente estos productos y evaluar su factibilidad en la alimentación humana.

Por otra parte, hoy se investigan y producen un conjunto de alimentos dirigidos a grupos de consumidores que reclaman una alimentación especial

(deportistas, diabéticos, obesos, personas con trastornos del metabolismo, etc.). Sin el auxilio de la química analítica estos estudios serían imposibles de completar satisfactoriamente.

El impacto y alcance de los métodos instrumentales en la producción y la investigación es enorme. Los diferentes campos de aplicación en el área de los alimentos, arriba referidos, constituyen tan solo algunos ejemplos de la extraordinaria importancia de la química analítica como herramienta indispensable para el desarrollo de investigaciones que pueden conllevar a nuevos hallazgos y descubrimientos en las ciencias alimentarias.

1.2. QUÍMICA ANALÍTICA. DEFINICIÓN Y CLASIFICACIÓN DE LOS MÉTODOS DE ANÁLISIS.

Para poder realizar el análisis químico de los alimentos, hay que auxiliarse de una de las más antiguas e importantes de las ramas de la química: "la química analítica", la cual brinda las herramientas necesarias para poder determinar quiénes son las sustancias que están presentes en los alimentos y en qué cantidades ellas se encuentran. Así, la química analítica puede definirse como la rama de la química que se ocupa de la identificación y cuantificación de un componente químico en una sustancia dada.

De esta definición se deriva que la química analítica se divide en dos grandes campos de actuación: el análisis cualitativo, cuyo objeto es identificar cuáles son los componentes que están presentes en una muestra, y el análisis cuantitativo, a través del cual se determina cuánto hay de cada componente en la muestra evaluada.

Para cumplimentar cualquiera de estos objetivos (cualitativos o cuantitativos), el procedimiento del cual se vale la química analítica se denomina *método analítico*. El *método analítico* puede definirse como el conjunto de operaciones físicas y químicas que permite identificar y/o cuantificar un componente químico, al cual se denomina "*analito*" en el sistema material que lo contiene, al cual se le denomina "*matriz*". Así por ejemplo, en la determinación de vitamina C en muestras de naranjas de diferentes variedades, las naranjas constituyen la "matriz" en la cual se desea determinar el "analito" (vitamina C).

Atendiendo a las características del procedimiento analítico y del principio general en el cual se fundamenta la determinación, los métodos de análisis químico pueden clasificarse en dos grandes grupos: métodos clásicos y métodos instrumentales

Métodos químicos clásicos: Son los métodos más antiguos e involucran generalmente la aplicación de una reacción química en la que interviene el constituyente que se desea determinar.

Métodos instrumentales: Constituyen un conjunto de procedimientos basados en la medición instrumental de alguna propiedad físico-química del sistema estudiado.

Ambos grupos de métodos pueden emplearse con fines cualitativos y cuantitativos. Sin embargo, el contenido de este texto estará centrado en el estudio de los métodos instrumentales de análisis[1].

1.3. METODOLOGÍA ANALÍTICA

La Química Analítica ha experimentado en los últimos 20 años un desarrollo espectacular. Este desarrollo no es más que una consecuencia de la realidad impuesta por el desarrollo de la sociedad. Actualmente los laboratorios analíticos independientemente de que se dediquen a la investigación o estén vinculados a la industria se enfrentan diariamente a problemáticas mucho más complejas que hace varias décadas.

El surgimiento de nuevos materiales implica la consideración de nuevas matrices y nuevos analitos. Si se enfoca esta realidad desde el punto de vista químico, encontramos una gran cantidad de materiales de diversa naturaleza y estado físico, que pueden estar compuestos por un número elevado de sustancias químicas, dentro de las cuales nos puede interesar uno, varios o todos los componentes, los cuales pueden estar presentes a su vez en diferentes concentraciones.

Lo ideal sería contar con un método analítico que requiera del mínimo número de operaciones, con el mínimo de muestra, en el cual el resultado pueda ser obtenido de forma rápida y a bajo costo y que cuente con adecuados criterios de calidad.

Ante esta realidad que hemos expuesto, contar con un método que reúna todas estas características es prácticamente imposible, pero lo que sí debe quedar claro es que cuando se concibe una metodología para enfrentar un determinado problema analítico, debe estar dirigida a garantizar al menos algunos de estos requerimientos.

En la práctica nos enfrentamos a múltiples dificultades entre las que podemos citar la complejidad de la matriz, aspecto que desde el comienzo de la investigación debe ser cuidadosamente valorado. Otra dificultad muy común es no contar con una metodología apropiada que se ajuste perfectamente a nuestra situación, que en muchos casos nos obliga a adoptar procedimientos ya reportados en la literatura científica, o a cambiar algunos de los pasos fundamentales.

Es necesario señalar que elaborar procedimientos analíticos no es fácil incluso para analistas experimentados. Por otra parte, cada vez aumentan más las exigencias de calidad para la aceptación de un método analítico, lo que exige esfuerzo y un riguroso tratamiento estadístico que permita considerar el resultado como confiable.

[1] Para obtener información sobre los métodos químicos clásicos véase: *Zumbado, H. Análisis Químico de los Alimentos. Métodos clásicos. Ed. Felix Varela. La Habana, Cuba, 2006.*

Por último, no podemos dejar pasar por alto factores tan importantes como son el tiempo y el costo del análisis. En ocasiones se nos exigen resultados rápidos, por lo que al diseñar la metodología del análisis debe contemplarse este aspecto. El costo es también esencialmente importante, sobre todo en nuestras condiciones.

En algunos casos pretendemos emplear métodos más caros pero más novedosos cuando quizás el problema pueda resolverse empleando métodos más sencillos y baratos.

El camino que conduce al conocimiento de la composición total o parcial de una matriz requiere indiscutiblemente de esfuerzo intelectual, aptitud, experiencia, intuición y sobre todo de un adecuado criterio químico analítico. Este criterio tiene muchas veces más peso que la disponibilidad de grandes y costosos instrumentos.

La solución es llegar a una metodología analítica que permita transformar el material (matrices alimentarias, en nuestro caso) en una muestra medible y que a su vez obtengamos resultados que puedan considerarse confiables. Para conseguir estos objetivos debe centrarse la atención tanto en las especies a analizar como en la matriz, lo cual es la base del denominado *"Enfoque Analítico".*

El Enfoque analítico es básicamente una cadena de operaciones que se construye a partir del cuestionamiento de aspectos esenciales para la realización del análisis. Veamos a continuación algunas de las interrogantes que surgen a la hora de acometer un problema analítico:

- ¿Qué especie (o especies) quiero medir y en que matriz se encuentran?
- ¿En qué rango de concentraciones están presentes?
- ¿Qué operaciones o procesos químicos, físicos o biológicos pueden afectar la concentración o la estabilidad de las especies objeto de estudio?
- ¿Qué técnica analítica es la adecuada para el estudio de dichas especies?
- ¿Qué componentes propios de la matriz pueden constituir interferencias en el análisis?
- ¿Qué nivel de precisión y exactitud requiere el método analítico para cumplimentar el objetivo propuesto?
- ¿Qué materiales y equipos se necesitan para ejecutar el proyecto?

Las respuestas a estas interrogantes permiten conformar una metodología analítica que permitirá abordar de forma integral el análisis. Esta metodología pudiera definirse como una serie de etapas y operaciones comunes a cualquier método analítico, que es necesario considerar a la hora de realizar el análisis. Este esquema está conformado básicamente por las siguientes etapas:

- Determinación de los objetivos analíticos

- Selección del método analítico
- Muestreo
- Preparación de la muestra
- Determinación
- Cálculos, reporte e interpretación de los resultados.

Estas etapas no pueden ser consideradas de forma independiente. Entre ellas existe una relación de interdependencia que permite que la metodología se conforme como una unidad integral. Analicemos ahora con detalle cada una de estas etapas.

1.3.1. Determinación de los objetivos analíticos.

La definición de los objetivos es la etapa que permite trazar la estrategia de análisis sobre la base de las respuestas a las primeras interrogantes que habíamos planteado:

- ¿Qué especies se van a determinar, o lo qué es lo mismo, quién o quiénes son los analitos?
- ¿En qué matriz se encuentran?
- ¿Qué tipo de análisis necesito realizar? En este caso nos estamos refiriendo a definir si es necesario realizar una cuantificación o si la simple detección cualitativa es suficiente.

Para analistas experimentados esta etapa pudiera parecer trivial, sin embargo en el caso de los estudiantes, o de analistas de poca experiencia es necesario dejar clara la diferencia entre objetivo analítico y el problema a resolver.

Por ejemplo, se detecta una intoxicación alimentaria en un grupo poblacional que ingirió croquetas de jamonada en un local gastronómico de trabajadores por cuenta propia.

El problema a resolver será identificar la sustancia tóxica responsable de la intoxicación, sin embargo para resolver esta problemática es necesario definir más de un objetivo analítico, que a su vez generan varias tareas analíticas. Por ejemplo:

- ¿En qué matriz biológica se va a realizar la determinación?: la jamonada del relleno, la harina, el aceite empleado para la fritura, la sal, etc.
- ¿Cuáles son los posibles analitos que pudieran estar contaminando la materia prima?: $NaNO_2$ como aditivo en la jamonada, naturaleza de la harina ¿es en realidad harina de trigo u otro producto de características físicas parecidas como por ejemplo un plaguicida?, calidad del aceite empleado, etc.

Indiscutiblemente de la correcta definición de los objetivos depende en gran medida el éxito de la determinación.

1.3.2. Selección del método analítico.

La selección del método analítico ha sido considerada siempre como una de las etapas de mayor importancia en el esquema de un análisis completo. Para la correcta selección del método adecuado para la realización de un análisis es necesario considerar diferentes aspectos tales como:

1. **Características del analito:** En este sentido se debe considerar la naturaleza química y las propiedades físico-químicas del componente que se desea cuantificar. No existe ningún método analítico universal, es decir que sea aplicable a la determinación de toda clase de analitos. De hecho no se utilizan los mismos métodos para la determinación de sustancias orgánicas que para sustancias inorgánicas o para la determinación de sustancias de bajo y alto peso molecular. Sin embargo no basta con tener en cuenta las características del analito, sino que es también importante tener en cuenta las características de la matriz.
2. **Características de la matriz:** Obviamente dentro de las características importantes a considerar está el estado de agregación y la complejidad de la matriz. No es lo mismo realizar un análisis sobre un producto líquido que sobre uno sólido, puesto que la matriz ha de sufrir diferentes tratamientos en función de su estado de agregación. Así mismo, estos tratamientos serán más engorrosos en la medida que la matriz sea más compleja, es decir, posea un mayor número de componentes, puesto que entonces el método seleccionado ha de ser más específico a fin de determinar solo aquella sustancia que interesa (analito) en presencia de un gran número de otras sustancias que coexisten en la matriz. Si por el contrario, se trata de una matriz con un reducido número de sustancias, resulta más fácil muchas veces la selección del método.
3. **Validación del método analítico**: La validación del método analítico es el proceso que permite establecer qué características del funcionamiento del método analítico son adecuadas para la aplicación que se pretende.

En este sentido es importante señalar que para obtener los mejores resultados deben considerarse todas las variables del método, que incluyen la etapa de muestreo, la preparación de la muestra, la detección y evaluación de los datos, es decir se deben considerar todas las etapas del esquema.

El objetivo principal de la validación analítica es el de asegurar que un procedimiento analítico dará resultados reproducibles y confiables que sean adecuados para el propósito previsto.

Hay importantes razones para validar los métodos de análisis. En primer lugar la validación es una parte integral del desarrollo de un método analítico, en segundo lugar, las Buenas Prácticas de Elaboración así lo exigen. Por otra parte y desde el punto de vista comercial los métodos validados permiten obtener datos fiables por lo que se facilitan las transacciones comerciales basadas en la aceptación mutua de los resultados.

Los estudios de validación constituyen una parte esencial en el desarrollo de técnicas analíticas encaminadas tanto al control de calidad, en la industria de los alimentos, como a estudios de conservación, almacenamiento y evaluación nutricional y toxicológica de productos destinados al consumo humano.

Los requisitos o criterios de validación que debe cumplir un método analítico y que deben ser determinados en el procedimiento de validación, según lo estipulado por diferentes organizaciones internacionales tales como: NMKL, (1996); AOAC, (2000); Codex Alimentarius, (2001) y IUPAC (2002) son: precisión, veracidad o justeza, linealidad, sensibilidad, límite de detección, límite de cuantificación, intervalo de concentración y selectividad, entre otros[2]. El en epígrafe 1.4.3 de este capítulo se abordan con profundidad algunos de estos parámetros de calidad.

1.3.3. Muestreo y toma de la muestra

En términos generales, los químicos analíticos no siempre le han dado la importancia y prioridad que en los resultados analíticos puede tener, y de hecho tiene, la etapa de selección de la muestra o muestreo. Con frecuencia, aún un analítico entrenado puede olvidar algunas de las reglas básicas del muestreo o puede aplicar estas de forma incorrecta. Tales errores pueden negar la validez de los resultados obtenidos.

En realidad, el analista no ha sido entrenado en el muestreo. En la mayoría de los casos, el analista no tiene responsabilidad en las fases de diseño y realización del muestreo, sino que el primer contacto que él tiene con esas operaciones es la de recepcionar la muestra de laboratorio.

Sin embargo, es importante que un químico analítico tenga un verdadero sentido de la incertidumbre involucrada en un muestreo, debido a que esta incertidumbre determina, en gran medida, la variabilidad que puede ser permitida en el análisis. Conociendo el error potencial de un muestreo, se conoce ya más de las dos terceras partes del error total del análisis.

El muestreo se define como un *proceso de selección de una muestra para ser analizada, de forma tal que sea representativa del conjunto del material del cual se ha tomado* y sea además congruente con la definición del problema analítico; dicho de otro modo, *la concentración del analito en la porción de la muestra que se analiza, debe ser igual a la concentración del analito en la población (lote, partida, etc.) de la cual se ha tomado la muestra*. De nada serviría realizar un análisis perfecto cuando la muestra no es representativa, ya que estos resultados no representarían la composición de todo el material de donde fue tomada la muestra y por lo tanto se obtendrían resultados no confiables.

[2] Para mayor información sobre los procedimientos de validación véase: *AOAC. Official Methods Validation Program" AOAC International Official Methods of Analysis." 17th Edition. Page XXIII. 2000; Codex Alimentarius. CXMAS – 09 – 1. "Directrices armonizadas para la validación interna de métodos de análisis de la IUPAC" 2001; IUPAC. "Harmonized Guidelines for the in-house validation of methods of analysis (Technical report)". Budapest. 2002; NMKL. Comité Nórdico de Análisis de Alimentos. "Validation of Chemical Analytical Methods". Procedimiento #4. Versión 1. 1996. Finlandia.*

Los procedimientos de muestreo, en casos particulares, pueden ser totalmente diferentes para cada tipo de producto, pues dependen del estado de agregación de la sustancia y de sus características particulares. Para cada tipo de material analizado existen instrucciones especiales concernientes a cómo realizar el muestreo y que cantidad de muestra debe tomarse de acuerdo con las particularidades específicas del material dado. Estas instrucciones aparecen en manuales de análisis técnicos conocidos como Normas de Muestreo.

El principio general de cualquier procedimiento de muestreo consiste en que *la muestra representativa debe estar compuesta del mayor número posible de porciones de sustancia tomadas de manera absolutamente arbitraria (al azar) de diversos lugares de la población que se estudia (partida, lote, etc.).*

Para comprender la necesidad del muestreo se debe tener presente que la mayoría de los alimentos son matrices complejas y heterogéneas. Un lote de un mismo producto en sus diferentes partes, trozos, granos, etc., puede tener una composición muy distinta. Cuanto mayor número de porciones de la sustancia se escojan al azar de sus diferentes partes, tanto mayor será la probabilidad de que todas las desviaciones eventuales del promedio se compensen y la composición de la muestra se acerque a la composición media de la sustancia que se analiza.

Por ejemplo, si se desea determinar el contenido de proteínas en un lote de arroz almacenado en sacos de 50 Kg y el lote está compuesto por 200 sacos colocados en varias estibas, no basta con tomar la muestra de un solo saco, sino que se hace necesario tomar al azar muestras de diferentes sacos y de diferentes lugares de los sacos seleccionados al azar, con vistas a que la muestra sea verdaderamente representativa de la población.

Usualmente la muestra representativa primaria no se emplea directamente en el análisis debido a que aún es muy grande (varios Kg) y heterogénea. Por eso se tritura (como resultado aumenta la homogeneidad de la sustancia) y debe disminuirse su tamaño. Uno de los procedimientos más empleados para reducir el tamaño de las muestras sólidas es el cuarteo. Este procedimiento consiste en lo siguiente: la muestra primaria triturada se extiende uniformemente sobre una superficie lisa de modo que resulte un cuadrado. Este se divide diagonalmente en cuatro triángulos, de los cuales se eliminan dos opuestos y los dos restantes se mezclan nuevamente entre sí. El material mucho más homogéneo obtenido de este modo se vuelve a cuartear tantas veces como sea necesario hasta reducir el tamaño de la muestra hasta un valor conveniente (50 g – 1 Kg o más) para finalmente almacenar cuidadosamente esta muestra y enviarla al laboratorio.

En este sentido, deben diferenciarse los términos *muestra bruta* y *poción de ensayo*. La *muestra bruta* es la porción del material tomado de la población inicial (lote de un proceso de producción de alimentos, almacén de sacos de arroz, etc.) que llega al laboratorio analítico y debe ser de un tamaño adecuado (entre 50 g y 1 Kg o más). La *porción de ensayo* es la cantidad de muestra tomada en el laboratorio por el analista para realizar el análisis, y su tamaño

depende de las características del método y de los objetivos del análisis. Usualmente estos términos no se distinguen y se habla de forma general de *muestra*, pero debe quedar claro a que muestra nos estamos refiriendo.

El caso considerado constituye solo un ejemplo ilustrativo de muestreo y toma de muestra para el caso de materiales sólidos envasados a granel. Obviamente para otros productos (conservas de frutas enlatadas, compotas, caramelos, bebidas envasadas, etc.) el procedimiento puede ser muy diferente.

El muestreo consta de dos fases: fase de diseño y fase de implementación. En la fase de diseño el analista aplica los principios estadísticos para generar un plan de muestreo. Dicho plan intenta minimizar las diferencias entre las propiedades estimadas para una muestra y las propiedades del lote en su totalidad. La fase de implementación involucra la realización física de la toma de las porciones estadísticamente diseñadas. En esta etapa hay que considerar la instrumentación del muestreo, los recipientes para las muestras así como el almacenamiento y la conservación.

1.3.4. Preparación de la muestra.

La etapa de preparación de muestra es una de las etapas que puede considerarse crítica en una metodología analítica. De forma general en la literatura científica suele dársele mayor importancia a la etapa de selección del método analítico que a la etapa de preparación de la muestra. Sin embargo, en los últimos años diversos autores han llamado la atención con respecto a la importancia de esta última etapa (tabla 1.2).

Tabla 1.2

Tiempo utilizado en diferentes etapas del proceso analítico

Etapa	**Porcentaje en base al tiempo total de análisis**
Gestión de datos	27%
Preparación de la muestra	61%
Muestreo	6 %
Determinación	6 %

Nótese que el mayor tiempo es consumido justamente en la etapa de preparación de muestra.

La mayoría de las determinaciones analíticas requieren de una preparación previa de la muestra. Esto obedece a diferentes razones entre las cuales se pudieran mencionar las siguientes:

1. Alta complejidad de la matriz, lo que aumenta la posibilidad de la presencia de interferencias. En este sentido se debe recordar que la complejidad de una matriz está relacionada con diferentes criterios y no solamente con el alto número de componentes.

2. Muestras muy diluidas, es decir, el o los analitos se encuentran en bajas concentraciones en la muestra original pudiendo encontrarse por debajo del límite de detección del método analítico.
3. Muestras muy concentradas, lo que pudiera ocasionar que el analito pueda dar una señal fuera de escala. En el caso más simple bastaría realizar un proceso de dilución para resolver este problema.
4. Las características físico químicas de la muestra (matriz) no son compatibles con el método analítico. Así por ejemplo el método puede exigir un análisis del analito en disolución a partir de una muestra sólida. En el caso más sencillo bastaría un proceso de disolución.

Así, el objetivo central del proceso de preparación de la muestra es el de *poner al analito en condiciones óptimas para ser analizado*; dicho de otro modo, *obtener muestras enriquecidas en las sustancias de interés analítico y asegurar la detección y/o cuantificación eficiente del o los analitos, así como la compatibilidad con el sistema analítico*, lo cual está obviamente relacionado con el éxito del análisis.

Por lo tanto, la etapa de preparación de la muestra requiere de un diseño y planificación rigurosos el cual debe realizarse atendiendo a los siguientes criterios:

1. Naturaleza química del analito.
2. Concentración del analito en la matriz.
3. Característica de la matriz (homogeneidad o heterogeneidad, estabilidad, volatilidad, solubilidad)
4. Naturaleza química de las sustancias interferentes
5. Características del método analítico seleccionado.

En el análisis de los alimentos, la preparación de la muestra incluye un número de etapas más o menos numerosas que dependen del tipo de producto (matriz) y del componente que se desea cuantificar (analito). Ahora bien, existen dos momentos perfectamente delimitados que pueden clasificarse como sub etapas y forman parte de la etapa de preparación de la muestra; estos momentos son: preparación de la muestra bruta y preparación de la porción de ensayo.

A. Preparación de la muestra bruta

Constituye un proceso de tratamiento de la matriz, dirigido a garantizar la representatividad de los resultados y a facilitar la posterior extracción del analito. Se realiza, como su nombre lo indica a la muestra que llega al laboratorio (muestra bruta) antes de proceder a la pesada o medida del volumen de la misma.

Usualmente, el procedimiento de preparación de la muestra bruta aparece descrito en normas que regulan e indican cómo debe realizarse esta etapa en

función de las características de la matriz. Así por ejemplo, en el análisis de conservas cárnicas en salmuera, la norma cubana exige que la muestra sea preparada de la siguiente forma:

"Se drena el contenido del envase y se toman varias porciones de diferentes zonas del producto en cantidades adecuadas. Las porciones tomadas se hacen pasar por una máquina moledora o batidora eléctrica si es necesario, mezclando después de cada operación para lograr una buena homogenización. Posteriormente se pasa a un recipiente cerrado herméticamente y se almacena bajo condiciones en que se preserve de cualquier deterioro o cambio en su composición. La muestra debe analizarse antes de las 24 horas posteriores a su preparación".

Nótese que este procedimiento es general y se realiza a los productos cárnicos en conserva, con independencia del analito que se desee cuantificar. En otras ocasiones, sin embargo, es necesario realizar procedimientos adicionales en función del método de cuantificación que será empleado posteriormente. Por ejemplo, si en esta misma muestra de carne en conserva se quiere acometer la determinación de grasa por un método de extracción con solventes orgánicos, se hace necesario, además de las operaciones indicadas, realizar un previo secado de la muestra puesto que elevados contenidos de humedad en el producto interfieren en la determinación.

B. Preparación de la porción de ensayo.

Esta etapa se inicia invariablemente con la medición exacta de la porción de la muestra homogenizada, puesto que los resultados finales del análisis se reportan en forma de concentraciones, es decir, se refiere la cantidad de analito cuantificado en función de la cantidad de muestra tomada para el análisis (porcientos, mg/g, mg/L, mg/100 g, etc.).

Una vez medida exactamente la porción de ensayo, se realizan diferentes tratamientos de mayor o menor complejidad, cuyo objetivo es el de separar el analito del resto de los componentes que pudieran constituir interferencias y facilitar la cuantificación.

A partir del análisis de estos aspectos se diseña una estrategia analítica la cual puede enfocarse desde dos puntos de vista:

1. A partir de la matriz original se realizan las operaciones químicas necesarias que permiten eliminar las interferencias. (Proceso de limpieza o "clean up")
2. A partir de la matriz original se extraen selectivamente los compuestos de interés (analitos). (Proceso de extracción)

Estas etapas se pueden acometer empleando métodos clásicos de mayor o menor complejidad, cuya descripción sería imposible de abordar totalmente en este texto dado el enorme número de posibilidades que existen. De cualquier

manera, relacionamos a continuación algunos de los procedimientos más comunes.

Dilución: Se emplea para muestras líquidas en las cuales el analito se encuentra en altas concentraciones o en productos fuertemente coloreados cuya coloración interfiere en el análisis. Es uno de los procedimientos más simples de preparación. Un típico ejemplo es la determinación de acidez total en vinagre comercial, el cual posee una elevada concentración de ácido acético que es necesario disminuir a través de una dilución.

Extracción sólido-líquido: Consiste en la extracción del analito a partir de una matriz sólida empleando un disolvente adecuado capaz de solubilizar el componente en estudio. En la determinación del contenido de cloruro de sodio por el método de Mohr en productos cárnicos, la porción pesada y homogenizada se suspende en agua destilada y se mantiene en reposo durante una hora para garantizar que el cloruro de sodio sea extraído y pase a la solución. Luego se filtra y se determina el contenido de cloruro de sodio en la solución salina.

El procedimiento de extracción sólido-líquido arriba descrito, es relativamente sencillo pero existen otros más complejos que pueden involucrar el empleo de varias etapas con diferentes solventes y operaciones más engorrosas.

Clarificación: Consiste en eliminar las interferencias por precipitación o floculación empleando un agente precipitante adecuado. Así por ejemplo, en la determinación de azúcares reductores en compotas, los pigmentos y otras macromoléculas que constituyen interferencias, se precipitan por adición de una solución saturada de acetato de plomo. El precipitado se separa por filtración y se obtiene una solución transparente que contiene los azúcares objeto de cuantificación. Este procedimiento se conoce también con el nombre de *defecación plúmbica*.

Destilación: El analito se separa del resto de los componentes que pueden interferir en el análisis aplicando un procedimiento de destilación con vapor de agua. La determinación de ésteres totales en rones es un típico ejemplo que requiere de un proceso de destilación a través del cual se obtienen los ésteres en el destilado que posteriormente se analiza.

Incineración: La incineración es el proceso de combustión de la materia orgánica que deja un residuo de material inorgánico conocido como cenizas. En algunas determinaciones de compuestos de naturaleza inorgánica se requiere eliminar primeramente el material orgánico para facilitar el análisis. Así por ejemplo, en la determinación de calcio en vinos por un método complejométrico, o en la determinación de metales por espectrometría de absorción atómica, la cuantificación se realiza sobre las cenizas del producto, obtenidas por incineración a altas temperaturas.

Digestión: Es un proceso de hidrólisis (ácida fundamentalmente) de la materia orgánica, que puede incluso, en función de las condiciones de tratamiento, producir agentes oxidantes que transforman la materia orgánica a dióxido de

carbono, vapor de agua y otros compuestos volátiles. La determinación de nitrógeno total por el método Kjeldahl incluye una etapa de digestión que transforma el nitrógeno orgánico en sulfato de amonio con el empleo de ácido sulfúrico concentrado y calor en presencia de un catalizador de sulfato de cobre. En esta determinación se realiza además una posterior destilación, por lo que constituye un ejemplo en que se combinan varios procedimientos con vistas a transformar el analito en una sustancia fácilmente cuantificable.

Reflujo: Es una operación que se realiza con el fin de propiciar o acelerar una reacción química entre dos sustancias mediante la aplicación de calor. Consiste en colocar las sustancias reaccionantes (en disolución), en un frasco erlenmeyer de tapa esmerilada conectado a un condensador de reflujo o tubo refrigerante, a través del cual circula agua. Se aplica calor al frasco erlenmeyer, mediante mechero, plancha de calefacción o baño termostatado, y la reacción ocurre a altas temperaturas sin pérdida de los reaccionantes, por cuanto los vapores desprendidos se condensan al chocar con el tubo refrigerante y caen nuevamente en el seno de la solución. Así por ejemplo, la determinación del índice de saponificación en aceites y grasas comestibles requiere obligatoriamente de una etapa de reflujo para que tenga lugar la reacción de neutralización entre los ácidos grasos y el hidróxido de potasio, ya que esta reacción no tiene lugar a temperatura ambiente.

Los procedimientos arriba explicados constituyen tan solo unos pocos ejemplos de las numerosas operaciones que pueden emplearse como parte de la preparación de la muestra.

La etapa de preparación de muestras no ha avanzado a la par del desarrollo de los métodos analíticos. Muchos de los métodos empleados son considerados clásicos y se utilizan desde hace muchos años. Sin embargo, en los últimos años, con la introducción de la extracción en fase sólida comenzó un proceso de desarrollo de los métodos de preparación de muestra que se ha visto incrementado con el empleo de los fluidos supercríticos y las microondas.

1.3.5. Procedimiento de determinación

La etapa de determinación consiste en acometer el método de cuantificación propiamente dicho, el cual presentará características particulares en función del analito que se cuantifique y del principio en que se fundamente la cuantificación (volumetría, gravimetría, espectrofotometría, cromatografía, etc.).

Al efectuar una determinación analítica cuantitativa, se debe seguir minuciosamente la metodología de trabajo establecida en la técnica analítica. Es necesario tener presente que los resultados del análisis son válidos solo en el caso de que se cumplan rigurosamente todas las condiciones planteadas en la metodología descrita, pues esta ha sido comprobada y validada en función de estas indicaciones. Cualquier desviación de las condiciones establecidas en la metodología original (cambio de algún reactivo por otro, modificación en los volúmenes adicionados o en la concentración de alguna de las soluciones

empleadas, etc.) conduce siempre a errores y disminuye apreciablemente la precisión y exactitud del método.

Con el mismo esmero se deben observar las reglas concernientes a la técnica de diversas operaciones (filtración, lavado y secado de los precipitados, valoración, incineración, destilación, etc.). Por más insignificantes que parezcan algunas de estas reglas, se debe tener presente que todas ellas son resultado de la experiencia acumulada por generaciones de químicos, y que solamente siguiéndolas del modo más riguroso, se puede obtener la precisión y exactitud deseada en los resultados del análisis.

1.3.6. Cálculos, reporte e interpretación de los resultados

El resultado final del análisis cuantitativo se calcula a partir de los resultados obtenidos experimentalmente (datos de las pesadas realizadas, mediciones de volúmenes obtenidos al efectuar el análisis, señal que se obtiene de un equipo instrumental, etc.).

Los cálculos de los resultados del análisis son una parte integrante del procedimiento analítico al igual que cualquier otra operación del mismo; de ahí que un error de cálculo entraña las mismas consecuencias que un error cometido en cualquier otra operación del análisis.

En un proceso de producción de alimentos, el resultado del análisis frecuentemente se utiliza para orientar y corregir el proceso tecnológico, inmediatamente después de recibir los resultados del laboratorio de control de calidad. Es evidente que, en este caso, un error de cálculo es inadmisible.

Así mismo, de nada valdría realizar correctamente los cálculos si no se sabe interpretar el resultado y tomar decisiones sobre las acciones que deben acometerse en función del resultado obtenido.

¿La magnitud cuantificada del analito indica un deterioro del producto que puede resultar dañino a la salud? ¿Se rechaza el producto y se retira del mercado? ¿Se mantiene el producto en el mercado por un corto período de tiempo? .Estas y otras muchas, son las interrogantes que pueden aflorar de un resultado analítico. El profesional de la rama de alimentos debe saber dar respuestas acertadas sobre la base de una rigurosa interpretación de los resultados.

1.4. LOS MÉTODOS INSTRUMENTALES DE ANÁLISIS DE LOS ALIMENTOS

A principios del siglo XX lo químicos comenzaron a hacer uso de fenómenos diferentes a los utilizados en los métodos clásicos (volumétricos y gravimétricos) para resolver los problemas analíticos. Así, para el análisis cuantitativo de una gran variedad de analitos inorgánicos, orgánicos y bioquímicos se empezaron a utilizar las medidas de sus propiedades físicas tales como la conductividad, el potencial de electrodo, la absorción o emisión de la luz, la relación masa/carga y la fluorescencia. Además, en la separación de mezclas complejas, las técnicas cromatográficas y electroforéticas altamente eficaces empezaron a reemplazar a la destilación, extracción y precipitación como etapa previa a su determinación

cualitativa o cuantitativa. A estos métodos más modernos para la separación y determinación de especies químicas se les conoce, en conjunto, como *métodos instrumentales de análisis*.

Muchos de los fenómenos en los que se fundamentan los métodos instrumentales se conocen desde hace más de un siglo. Sin embargo, su aplicación por la mayor parte de los químicos se retrasó por falta de una instrumentación sencilla y fiable. De hecho, el crecimiento de los métodos instrumentales de análisis modernos ha ido paralelo al desarrollo de la industria electrónica e informática.

1.4.1. Tipos de métodos instrumentales

Al abordar los diferentes tipos de métodos instrumentales es conveniente considerar las propiedades químicas y físicas que se puedan utilizar en el análisis cualitativo o cuantitativo. La tabla 1.3 enumera la mayoría de las propiedades características que se utilizan actualmente en análisis instrumental. La mayor parte de ellas requieren una fuente de energía para estimular una respuesta medible que procede dcl analito. Por ejemplo, en emisión atómica se requiere un aumento de temperatura del analito para que, en primer lugar se produzcan átomos en estado gaseoso y después para excitar dichos átomos a niveles de mayor energía. Posteriormente emiten una radiación electromagnética característica que es la cantidad medida por el instrumento. La energía de excitación puede darse como un cambio térmico rápido, tal como sucede en el ejemplo anterior, donde la radiación electromagnética de la región del espectro seleccionada se transforma en un parámetro eléctrico tal como potencial, corriente o carga o bien, tener formas más sutiles, intrínsecas al propio analito.

Tabla 1.3.

Propiedades químicas y físicas que se emplean en los métodos instrumentales.

Propiedades	Métodos instrumentales
Emisión de la radiación	Espectroscopia de emisión* (rayos X, UV*, visible* y electrones), fluorescencia*, fosforescencia y luminiscencia (rayos X, UV, visible).
Absorción de la radiación	Espectrofotometría y fotometría* (rayos X, UV*, visible*, IR), resonancia magnética nuclear y espectroscopia de resonancia de espín electrónico.
Dispersión de la radiación	Turbidimetría, nefelometría y espectroscopia Raman.
Refracción de la radiación	Refractometría*, interferometría.
Difracción de la radiación	Métodos de difracción de rayos X u electrones.
Rotación de la radiación	Polarimetría*, dispersión rotatoria óptica.
Potencial eléctrico (*)	Potenciometría*.
Carga eléctrica	Culombimetría.
Corriente eléctrica	Polarografía, amperometría, electroforesis.
Resistencia eléctrica	Conductimetría.
Razón masa / carga	Espectrometría de masas.
Velocidad de reacción	Métodos cinéticos.

Propiedades	Métodos instrumentales
Propiedades térmicas	Calorimetría de barrido diferencial, análisis térmico diferencial, métodos de conductividad térmica.
Radiactividad	Métodos de activación y de dilución isotópica.
Solubilidad	Cromatografía de reparto o partición*.
Adsorción	Cromatografía de adsorción*.
Masa molar	Cromatografía de filtración sobre gel*.
Acido base	Cromatografía de intercambio iónico*.

Obsérvese que las seis primeras entradas de la tabla 1.3 están relacionadas con las interacciones del analito y la radiación electromagnética. En la primera, el analito origina la señal radiante: las cinco siguientes implican cambios en el haz de radiación producidos por su interacción con la muestra. Las cuatro que siguen son eléctricas y luego, cuatro propiedades diversas se agrupan conjuntamente: la relación masa/carga, la velocidad de reacción, las señales térmicas y la radiactividad. Finalmente se agrupan cuatro propiedades que se explotan en los métodos cromatográficos.

La segunda columna de la tabla 1.3 indica los nombres de los métodos instrumentales relacionados con las distintas propiedades físicas y químicas. Hay que tener en cuenta que no siempre es fácil elegir el método óptimo de entre la cantidad de técnicas instrumentales disponibles, así como de sus homólogos clásicos. Algunas de ellas son más sensibles que las técnicas clásicas, pero otras no. Un método instrumental puede ser más selectivo para ciertos compuestos o combinaciones de elementos, pero para otros, un análisis volumétrico o gravimétrico puede tener menores interferencias.

Son igualmente difíciles de establecer las generalizaciones sobre la exactitud, la idoneidad o el tiempo empleado. Tampoco es necesariamente cierto que los procedimientos instrumentales utilicen aparatos más sofisticados y más costosos; en realidad, la balanza analítica electrónica moderna que se emplea en las determinaciones gravimétricas es un instrumento más complejo y refinado que muchos de los usados en algunos de los métodos mencionados en la tabla 1.3.

Como se ha indicado, existe un grupo de procedimientos instrumentales que se utilizan para separar y resolver compuestos afines. La mayoría de ellos están relacionados con la cromatografía y la electroforesis. Para completar el análisis, tras las separaciones cromatográficas, se suele usar alguna de las propiedades de la tabla 1.3. Con esta finalidad se han utilizado, por ejemplo, la conductividad térmica, la absorción en el infrarrojo y el ultravioleta, el índice de refracción y la conductancia eléctrica.

En el presente texto se abordarán los principios, las aplicaciones y las características de funcionamiento de los métodos instrumentales señalizados con un asterisco (*) en la tabla 1.3, por cuanto éstos son los de mayor aplicación en

el análisis de los alimentos. Los métodos clásicos no se tratarán dado que se supone que el lector habrá aprendido estas técnicas en estudios anteriores.

1.4.2. Instrumentos para el análisis

Un instrumento para el análisis químico transforma la información relacionada con las propiedades físicas o químicas del analito en información que pueda ser manipulada e interpretada por un ser humano. Por tanto, un instrumento analítico puede considerarse como un dispositivo de comunicación entre el sistema objeto de estudio y el científico.

Para conseguir la información del analito deseada es necesario proporcionar un estímulo, generalmente en forma de energía electromagnética, eléctrica, mecánica o nuclear, como se muestra en la figura 1.1. El estímulo provoca una respuesta del sistema objeto de estudio, en la cual la naturaleza y magnitud de la misma se rigen por las leyes fundamentales de la Química y de la Física. La información resultante radica en el fenómeno que surge de la interacción del estímulo con el analito. Un ejemplo habitual es el paso de una banda estrecha de longitudes de onda de luz visible a través de una muestra para medir la capacidad de absorción del analito. Se determina la intensidad de la luz antes y después de su interacción con la muestra y la relación entre ellas proporciona la medida de la concentración del analito.

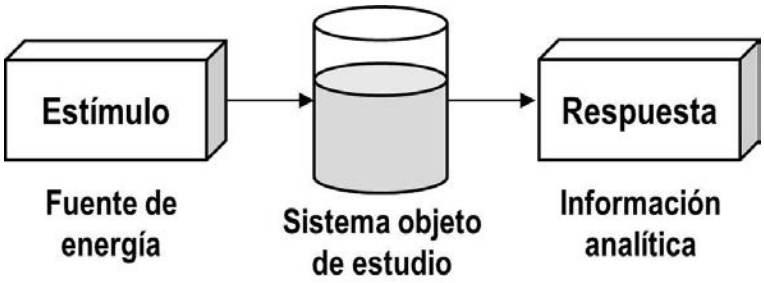


Figura 1.1. Diagrama de bloques del proceso completo de una medida instrumental

1.4.2.1. Detectores, transductores y sensores

Los términos: detector, transductor y sensor se utilizan, con frecuencia, como sinónimos, pero tienen un significado con matices diferentes. El término más general de los tres, detector, se refiere a un dispositivo mecánico, eléctrico o químico que identifica, registra o indica un cambio en alguna de las variables de su entorno, tal como la presión, La temperatura, La carga eléctrica, la radiación electromagnética, la radiación nuclear, las partículas o las moléculas. Este término se ha convertido en un comodín, hasta el punto de que, a menudo, se denominan detectores a instrumentos enteros. En el contexto del análisis instrumental, se debería utilizar el término detector con el sentido general con el que lo acabamos de definir, y se debería utilizar sistemas de detección para referirse al conjunto completo de dispositivos que indican o registran cantidades

físicas o químicas. Un ejemplo es el detector de UV (ultravioleta) utilizado, a menudo, para indicar o registrar la presencia de los analitos eluidos en cromatografía líquida.

El término transductor se refiere, de manera específica, a los dispositivos que convierten la información de dominios no eléctricos en dominios eléctricos y viceversa. Algunos ejemplos de transductores son los fotodiodos, fotomultiplicadores y otros fotodetectores electrónicos que producen corrientes o potenciales proporcionales a la potencia radiante de la radiación electromagnética que incide en sus superficies.

Por otra parte, el término sensor se reserva en este texto para el tipo de dispositivos analíticos que son capaces de controlar determinadas especies químicas de manera continua y reversible. Ejemplos de sensores lo constituyen el electrodo de vidrio y otros electrodos selectivos de iones utilizados en los métodos potenciométricos.

1.4.2.2. Dispositivos de lectura

Un dispositivo de lectura es un transductor que convierte la información que procede de un dominio eléctrico a otro que sea comprensible para el observador. Generalmente la señal transformada tiene la forma de la señal de salida alfanumérica o gráfica en un tubo de rayos catódicos, de una serie de números en un visualizador digital, de la posición de una aguja en una escala métrica o, en ocasiones, de impresiones en una placa fotográfica o de un trazo en un papel de registro. En algunos casos, el dispositivo de lectura se puede preparar para que proporcione directamente la concentración del analito.

1.4.2.3. Microprocesadores y ordenadores en los instrumentos

La mayoría de los instrumentos analíticos modernos disponen, o están acoplados, a uno o más dispositivos electrónicos sofisticados y a convertidores de dominios de los datos, como los amplificadores operacionales, los circuitos integrados, los convertidores analógico-digitales y digital-analógicos, los contadores, los microprocesadores y ordenadores.

Para apreciar la capacidad y las limitaciones de estos instrumentos, es necesario que el investigador tenga, al menos, un conocimiento cualitativo del funcionamiento y de las posibilidades de estos dispositivos.

1.4.3. Parámetros de calidad de los métodos e instrumentos

En la tabla 1.4 se enumeran los criterios cuantitativos de funcionamiento de los instrumentos, criterios que se pueden utilizar para decidir si un determinado método instrumental es o no adecuado para resolver un problema analítico.

Tabla 1.4.

Criterios numéricos para seleccionar métodos analíticos

Criterio	Parámetros de calidad
1. Precisión	Desviación estándar absoluta, desviación estándar relativa, coeficiente de variación, varianza
2. Veracidad	Porcentaje de recuperación
3. Linealidad	Regresión lineal, coeficiente de determinación
4. Sensibilidad	Sensibilidad de calibración, sensibilidad analítica
5. Límite de detección	Blanco más tres veces la desviación estándar del blanco
6. Límite de cuantificación	Blanco más diez veces la desviación estándar del blanco
7. Intervalo de concentración	Concentración entre el límite de cuantificación (LOQ) y el límite de linealidad (LOL)
8. Selectividad	-

Estas características se expresan en términos numéricos y se denominan parámetros de calidad. Para un problema analítico dado, los parámetros de calidad permiten reducir la elección de los instrumentos a tan sólo unos pocos y entonces la selección entre ellos se hace con criterios cualitativos de funcionamiento tales como: la velocidad, la facilidad y comodidad del método, la habilidad del operador, el costo y disponibilidad del equipo así como el costo por muestra.

A continuación, nos detendremos en la descripción y análisis de cada uno de estos criterios de calidad:

1.4.3.1. Precisión

La precisión describe la reproducibilidad de los resultados; es decir, la concordancia entre los valores numéricos de dos o más medidas replicadas o medidas que se han realizado exactamente de la misma forma. En general, la precisión de un método analítico se obtiene fácilmente mediante la simple repetición de la medida.

La precisión indica la medida del error aleatorio, o indeterminado, de un análisis. Los parámetros de calidad de la precisión son la desviación estándar absoluta, la desviación estándar relativa, el coeficiente de variación y la varianza. Estos términos se definen en la tabla 1.5.

Un método o un instrumento serán más precisos, en tanto menor coeficiente de variación se obtenga, es decir, cuanto más se acerquen entre sí los resultados obtenidos de varios análisis realizados a una misma muestra.

Tabla 1.5.

Parámetros de calidad para la precisión de los métodos analíticos

Parámetro	**Expresión para el cálculo**
Desviación estándar absoluta, s	$S = \sqrt{\frac{\sum(\overline{X} - X_i)^2}{n-1}}$
Desviación estándar relativa, RSD	$RSD = \frac{S}{\overline{X}}$
Coeficiente de variación, CV	$CV = \frac{S}{\overline{X}} \cdot 100$
Varianza	S^2

donde

$\overline{X}$ es el valor promedio obtenido de las diferentes repeticiones

X_i es el valor individual obtenido para cada una de las diferentes determinaciones

n es el número de determinaciones (repeticiones realizadas)

Veamos un ejemplo:

En un estudio del contenido de grasa en chocolate en polvo se ensayaron 2 métodos analíticos realizando 8 repeticiones para cada técnica y se obtuvieron los siguientes resultados.

	Resultados obtenidos para las 8 repeticiones (g grasa/100g de muestra)							
Método A	3,2	3,5	3,2	3,4	3,3	3,4	3,3	3,3
Método B	3,1	3,2	3,4	3,5	3,6	3,4	3,3	3,4

Si se desea calcular la precisión de ambos métodos el procedimiento a seguir sería:

Método A

$$\overline{X} = \frac{3,2 + 3,5 + 3,2 + ... + 3,3}{8}$$

$$\overline{X} = 3,32$$

$$S = \sqrt{\frac{(3,32-3,2)^2 + (3,32-3,5)^2 + ... + (3,32-3,3)^2}{8-1}}$$

$$S = 0,1035$$

$$CV = \frac{0,1035}{3,32} \times 100$$

$$CV = 3,1\%$$

Método B

$\overline{X} = 3{,}4$

$S = 0{,}2$

$CV = 5{,}9\%$

Obviamente el método A es más preciso que el método B, dado que posee un menor coeficiente de variación (3,1 % < 5,9 %).

Los valores de coeficiente de variación reportados para que un método analítico sea considerado preciso, se mueven en rangos más o menos amplios en la literatura científica que aborda esta temática, pero con independencia de los valores reportados como aceptables para el coeficiente de variación, estos deben ser tomados solo como una referencia aproximada. Para concluir si realmente un método es o no preciso se requiere de la aplicación de métodos estadísticos tales como el cálculo del intervalo de confianza entre otras pruebas.

Debe señalarse que el coeficiente de variación puede también emplearse para determinar la precisión de un analista; siempre y cuando, el método que se aplica esté previamente validado y se considere preciso.

1.4.3.2. Veracidad o justeza

La veracidad o justeza puede definirse como la proximidad de la concordancia entre el valor promedio obtenido en una serie de resultados de ensayo y el valor de referencia aceptado de la propiedad analítica que se está midiendo, o sea, el contenido verdadero de un analito dentro de la muestra en estudio. Si la diferencia entre el valor hallado y el valor verdadero es pequeña, la exactitud es buena. Una diferencia grande significa que la exactitud es inadecuada y revela la existencia de errores determinados que deberían corregirse.

La falta de veracidad puede ser por defecto o por exceso:

a- Las desviaciones por exceso suelen producirse cuando existen interferencias analíticas del método y la selectividad no es la adecuada: los resultados finales son superiores a los verdaderos. En este caso, debería modificarse el método para hacerlo más selectivo.

b- Las desviaciones por defecto suelen darse en métodos analíticos muy laboriosos en varias fases, extracciones, purificaciones, etc., que se traducen inevitablemente, en una disminución de la recuperación.

La veracidad se expresa matemáticamente en forma de porcentaje de recuperación de la cantidad del analito presente en la muestra, o bien en forma de diferencia entre el valor hallado y el valor verdadero. Lo más usual es emplear como parámetro de medida el porcentaje de recuperación:

$$\%\ Recuperación = \frac{Promedio\ de\ los\ valores\ obtenidos\ experimentalmente\ (\overline{X})}{Valor\ real} \cdot 100$$

La determinación del porcentaje de recuperación se puede llevar a cabo a través de tres procedimientos: A.) análisis repetido de una muestra de concentración única conocida, B.) método de adición de patrón y C.) comparación con otro método analítico ya validado.

A. Análisis repetido de una muestra de concentración única y conocida.

La muestra generalmente será una solución de concentración conocida formada por adición de una cantidad única de patrón de analito.

Esta solución se analiza varias veces (n = 6 ó 10) por el método que se evalúa y se calcula el % de recuperación. Por ejemplo, si se desea evaluar la veracidad de un método de determinación de vitamina C en jugo de naranja, se prepara una solución de un patrón de vitamina C a una única concentración (10 mg/100mL), la cual constituye el valor real, y se determina el contenido de vitamina C a través del método que desea evaluarse.

Supongamos que se obtuvieron los siguientes resultados:

Resultados obtenidos para 8 repeticiones (mg vit C/100 mL)								*Valor real (mg/100mL)*
9,05	9,16	9,21	8,91	9,11	8,95	9,09	9,25	10

El % recuperación será:

$$\%\ Recuperación = \frac{Promedio\ de\ los\ valores\ obtenidos\ experimentalmente\ (\bar{X})}{Valor\ real} \cdot 100$$

$$\%\ Recuperación = \frac{9{,}09}{10} \cdot 100$$

$$\%\ Recuperación = 90.9\ \%$$

Este procedimiento posee el inconveniente de realizar el análisis en una solución patrón del analito y no sobre la matriz, por lo que no considera la influencia de posibles sustancias interferentes que pudieran existir en la matriz. Tal dificultad puede minimizarse empleando el procedimiento de adición de patrón.

B. Método de adición de patrón.

En este caso se trabaja con el extracto del analito obtenido de la matriz original por un procedimiento adecuado. De esta solución se toman como mínimo dos alícuotas, a una de ellas se le añade una cantidad conocida de un patrón de referencia del analito, y ambas se analizan en paralelo.

Un patrón de referencia es una sustancia de elevada pureza y estructura y composición idénticas al analito que se determina. Así, por ejemplo, un patrón de referencia de la vitamina C consiste en ácido ascórbico altamente puro. Hoy en día se comercializan patrones de referencia para casi todas las sustancias conocidas y usualmente se adquieren a altos precios.

Los resultados obtenidos de ambas determinaciones se procesan y la diferencia (muestra + patrón) – (muestra sin patrón) indica la cantidad cuantificada del

patrón añadido por el método en cuestión. Este valor se compara con la cantidad de patrón añadido (valor verdadero) y los resultados se expresan como porcentaje de recuperación.

Retomando el ejemplo de vitamina C en el jugo de naranja empleando este procedimiento, supongamos que se siguió la metodología descrita en la figura 1.2.

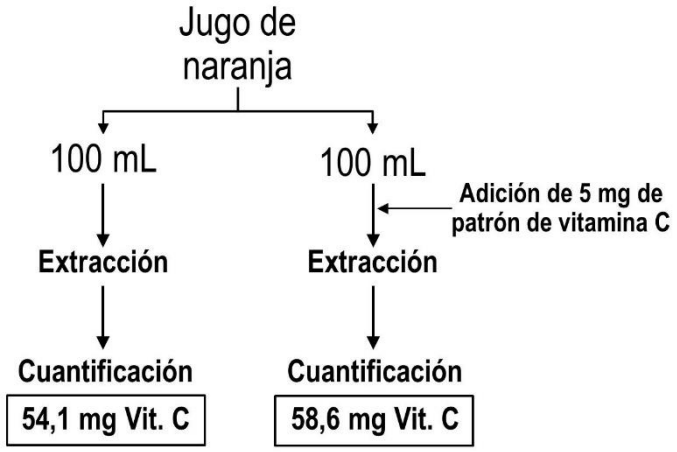


Figura 1.2. Metodología seguida para el ensayo de recuperación

Con estos resultados se puede calcular la cantidad de patrón cuantificado (PC) por el método, según:

$$m(PC) = m(vit.\ C)_{PATRON + MUESTRA} - m(vit.\ C)_{MUESTRA}$$

$$m(PC) = 58{,}6\ mg - 54{,}1\ mg$$

$$m(PC) = 4{,}5\ mg$$

calculando ahora el porcentaje de recuperación

$$\%\ Recuperación = \frac{Promedio\ de\ los\ valores\ obtenidos\ experimentalmente\ (\bar{X})}{Valor\ real} \cdot 100$$

y se sabe que:

$$valor\ obtenido = m\ (PC) = 4{,}5\ mg$$

$$valor\ real = m\ (patrón\ añadido) = 5\ mg$$

entonces:

$$\%\ Recuperación = \frac{4{,}5\ mg}{5\ mg} \cdot 100$$

$$\%\ Recuperación = 90\ \%$$

Aunque en este ejemplo se han procesado los resultados con un solo valor calculado para cada caso (muestra + patrón) y (muestra sin patrón), en la práctica deben realizarse repeticiones ($n > 7$) y realizar los cálculos con los valores promedios.

Si la adición del patrón del analito se realiza desde las primeras fases del estudio (directamente a la matriz, como en el ejemplo considerado) el % Recuperación indica la veracidad del método. Por el contrario, si la adición del patrón se efectúa inmediatamente antes de la medición, el %Recuperación solo indicará la veracidad del instrumento.

C. Comparación con otro método analítico ya validado.

Otra posibilidad para conocer la exactitud de un método analítico es la comparación de los resultados obtenidos por este, con los resultados obtenidos a través de otro método ya validado.

En este procedimiento se parte de una muestra homogénea que se analiza repetidamente ($n > 6$) por el método analítico nuevo y por el método de referencia.

Para cada serie de resultados se calcula la media y la desviación estándar y se realizan pruebas estadísticas (t de student) para conocer si existen diferencias entre las medias obtenidas por ambos métodos.

1.4.3.3. Linealidad

Se entiende por Linealidad la capacidad de un método analítico de obtener resultados proporcionales a la concentración de analito en la muestra dentro de un intervalo determinado. Dicho de otro modo, la Linealidad es la proporcionalidad entre la concentración del analito y la respuesta del instrumento en un intervalo o rango de concentraciones.

El ensayo de Linealidad puede efectuarse tanto sobre soluciones de concentraciones crecientes del analito que se determina o sobre muestras problemas a las que se han adicionado cantidades crecientes de un patrón del analito. En ambos casos el procedimiento se conoce como *"curva de calibración"* o *"curva de calibrado"*.

Los pasos generales para la realización de una curva de calibración son los siguientes:

1. Se prepara una serie de soluciones de un patrón del analito a concentraciones crecientes y se procede a su determinación en cada solución aplicando el método que se evalúa y obteniéndose para cada solución una respuesta o señal (mL consumidos, absorbancia, índice de refracción, etc.). el número de soluciones puede estar comprendido entre 6 y 10 y las concentraciones se seleccionan de acuerdo con las cantidades esperadas del analito en la muestra.

Así, por ejemplo, en el análisis de la Linealidad de un método de determinación de proteínas solubles en un extracto proteico de harina de soya se preparan soluciones de una proteína patrón (albúmina de suero bovino) a concentraciones de 0,1; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 y 1 mg/mL y se procede al análisis midiendo la

respuesta del método analítico (pudiera ser una señal instrumental como por ejemplo absorbancia), para cada una de las soluciones preparadas.

2. Se determina la proporcionalidad existente entre la concentración y la respuesta del método analítico, calculando por el método de ajuste mínimos cuadrados la ecuación de regresión lineal del tipo.

$$y = mx + a$$

Donde: x = *concentración,* m = *pendiente,* y = *respuesta del instrumento,* a = *intercepto*

Los términos *m (pendiente)* y *a (intercepto)* pueden ser calculados a través de las siguientes expresiones matemáticas

$$m = \frac{\sum xy - \frac{\sum x \sum y}{n}}{\sum x^2 - \frac{\left(\sum x\right)^2}{n}}$$

$$a = \frac{\sum y - m\sum x}{n}$$

donde: *n es el número de soluciones preparadas*.

Se calcula además el *coeficiente de determinación* (R^2) el cual refleja el grado de relación o proporcionalidad entre las variables concentración (x) y la respuesta del instrumento (y). El coeficiente de determinación toma valores entre 0 y 1 y mientras más se acerque a uno, mas linealidad existe entre las variables evaluadas, es decir más lineal es el método analítico.

Retomando el ejemplo de la determinación de proteínas solubles, supongamos que se obtuvieron las siguientes respuestas (y) para cada concentración (x) ensayada:

mg de proteína /mL (x)	**0,1**	**0,2**	**0,4**	**0,6**	**0,8**	**1**
Respuesta del instrumento (y)	0,019	0,040	0,076	0,111	0,156	0,216

Al calcular la ecuación de regresión se obtuvo:

$$y = 0{,}2063\,x - 0{,}046$$

y un coeficiente de determinación (R^2) igual a 0,9931 lo cual demuestra que el método considerado presenta una buena linealidad, en el rango de concentraciones estudiadas (0,1—1mg/mL).

En el capítulo 3, epígrafe 3.7.2.2, se profundizará sobre la utilidad de la curva de calibración como procedimiento de cuantificación y sobre el tratamiento estadístico pertinente.

1.4.3.4. Sensibilidad

En general se acepta que la sensibilidad de un instrumento o de un método es una medida de su capacidad de diferenciar pequeñas variaciones en la concentración del analito. Dos factores limitan la sensibilidad: la pendiente de la curva de calibrado y la reproducibilidad o precisión del sistema de medida. Entre dos métodos que tengan igual precisión, será más sensible aquel cuya curva de calibrado tenga mayor pendiente. Obviamente si dos métodos tienen curvas de calibrado con igual pendiente, será más sensible aquel que presente la mejor precisión.

En un método analítico sensible, ligeros incrementos de la concentración del analito provocan incrementos notables de la señal o respuesta que se mide.

Sensibilidad de calibrado

La definición cuantitativa de sensibilidad, aceptada por la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC), es la de *sensibilidad de calibrado*, que se define como la pendiente de la curva de calibrado a la concentración objeto de estudio. La mayoría de las curvas de calibrado que se usan en química analítica son lineales y se pueden representar mediante la ecuación

$$S = mc + S_{bl}$$

en la que S es la señal medida, c es la concentración del analito, S_{bl}, es la señal instrumental de un blanco y m es la pendiente de la línea recta. El valor de S_{bl} será el intercepto, es decir, la intersección de la recta con el eje y. En dichas curvas, la sensibilidad de calibrado es independiente de la concentración c y es igual a la pendiente m. La sensibilidad de calibrado como parámetro de calidad tiene el inconveniente de no tener en cuenta la precisión de las medidas individuales.

Sensibilidad analítica

Mandei y Stiehler consideraron la necesidad de incluir la precisión en un tratamiento matemático coherente para la sensibilidad y proponen la siguiente definición para la sensibilidad analítica, representada por γ

$$\gamma = m/S_S$$

Aquí, m es de nuevo la pendiente de la curva de calibrado y S_S es la desviación estándar de las medidas.

La sensibilidad analítica tiene la ventaja de ser relativamente insensible a los factores de amplificación. Por ejemplo, al aumentar la ganancia de un instrumento por un factor de cinco, el valor de m se incrementará en cinco veces. Sin embargo, este aumento vendrá acompañado, en general, del correspondiente aumento en S_S, y por tanto la sensibilidad analítica se mantendrá prácticamente constante. La segunda ventaja de la sensibilidad analítica radica en su independencia de las unidades de medida de S.

Una desventaja de la sensibilidad analítica es que generalmente depende de la concentración, ya que S_S puede variar con ella.

1.4.3.5. Límite de detección

El límite de detección es la mínima concentración o la mínima masa de analito que se puede detectar para un nivel de confianza dado. Dicho de otro modo, es la cantidad o el contenido de un analito que corresponde a la señal de medición más baja que con cierta confianza estadística puede ser interpretada como un indicador de que el analito está presente en la solución, pero no necesariamente permitiendo su exacta cuantificación.

El límite de detección es por tanto un parámetro analítico de gran interés en ensayos de límites, análisis de trazas, contaminantes y productos de degradación. Los términos cualitativos que aparecen en muchas publicaciones como "ausencia de..." o "no detectado", tiene su expresión numérica en el límite de detección. Es más correcto decir "menos de 1μg/g" que "ausencia de..."

Experimentalmente, el límite de detección se puede determinar realizando de 20 a 30 medidas del blanco, preferiblemente durante un amplio período de tiempo. El límite de detección se calcula entonces como tres veces la desviación estándar absoluta de la media obtenida de los resultados del blanco (tres desviaciones estándar corresponden a una confianza de 99%).

Algunos métodos analíticos producen señales inciertas en la muestra-blanco. En tales casos puede intentarse ampliar el ruido del instrumento y establecer el límite de detección como tres veces la desviación típica del ruido.

Cuando se amplía el ruido del instrumento, se deben utilizar extractos de la muestra-blanco (muestras-blanco concentradas). Este extracto debe ser, además, significativamente más concentrado que los extractos de muestras normales con el fin de establecer que no haya interferencia de ningún componente.

El límite de detección es muy importante en el análisis elemental de trazas. Por otro lado, es generalmente innecesario estimar este límite cuando se evalúan métodos para la determinación de componentes principales de los alimentos.

1.4.3.6. Límite de cuantificación

El límite de cuantificación de un procedimiento o de un instrumento analítico es la cantidad más baja de analito en una muestra que puede ser cuantitativamente determinada con cierta confianza. A este límite también se le llama límite de determinación.

Para su determinación experimental se analizan un número de muestras blanco entre 20 y 30. El límite de cuantificación se calcula como 10 veces la desviación estándar de la media de la muestra-blanco. La cantidad o el contenido de las muestras, se determina a partir de la curva de calibración.

Cuando se evalúan métodos cuantitativos, es importante definir y estimar la concentración más baja que puede ser medida con una precisión suficientemente definida. El procedimiento recomendado arriba está basado en la suposición de que la precisión en el límite de determinación es igual a un análisis blanco (dominio del ruido de fondo). Una medición correspondiente a 10 desviaciones típicas tendrá entonces una precisión relativa del 30% ya que la precisión absoluta (99% confianza, 10-15 mediciones) se estima para tres desviaciones típicas.

El límite de cuantificación es, por lo tanto, un término cuantitativo (menor cantidad medible) mientras que el límite de detección es cualitativo (menor cantidad detectable).

La determinación práctica de los límites de detección y cuantificación es laboriosa, por lo que solo se efectúa en el caso de métodos empleados para el análisis de trazas, contaminantes e impurezas a muy bajas concentraciones.

Si las concentraciones a determinar son elevadas, se puede sustituir su estudio por la determinación de la precisión y la veracidad a la concentración más baja que presente el analito en la práctica.

1.4.3.7. Intervalo de concentración

El intervalo de concentración, también llamado intervalo de medición, es el intervalo lineal de un método analítico o de un instrumento, que va desde la concentración más pequeña a la que se puede realizar la cuantificación (límite de cuantificación, LOQ) hasta la concentración a la que la curva de calibrado se desvía de la linealidad (límite de linealidad, LOL). Para las medidas cuantitativas se toma como límite inferior, en general, la que corresponde a diez veces la desviación estándar de las medidas repetidas en un blanco o $10s_{bl}$.

La figura 1.3 ilustra la definición de intervalo lineal de un método analítico.

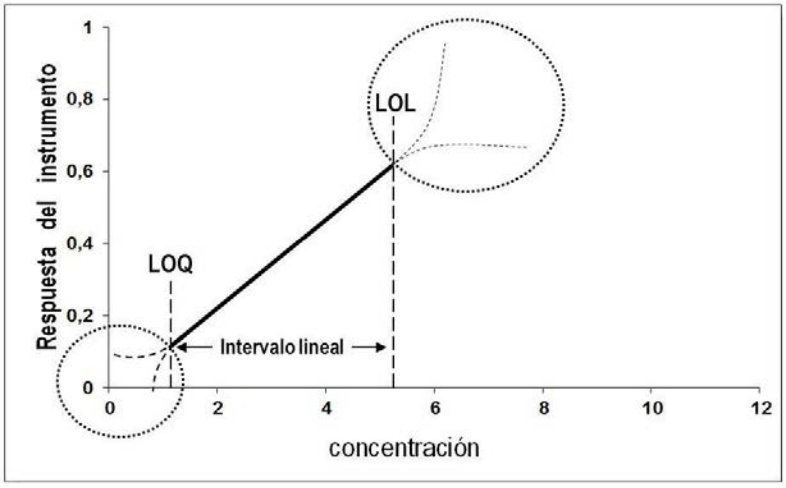


Figura 1.3. Intervalo lineal de un método analítico.
LOQ= límite de cuantificación, LOL= límite de linealidad

Algunos ejemplos de la pérdida de linealidad a bajas y altas concentraciones se relacionan a continuación:

- Los métodos espectrométricos usualmente tienen un rango lineal de trabajo hasta una cierta concentración. A concentraciones superiores, la curva se inclina hacia el eje de las concentraciones. A menos que el método vaya a ser utilizado para fines muy limitados en un rango de concentración conocida, es necesario estudiar la extensión del rango lineal. Además, es meritorio determinar en qué medida se satisfacen para este rango los requisitos respecto a la precisión y la veracidad. En la práctica, la limitación relativa a la parte inferior de la curva patrón se obtiene en la forma de límite de cuantificación.
- Los electrodos de ión selectivo muestran una respuesta que tienen una relación lineal contra el logaritmo de la concentración para un amplio rango de concentración (generalmente desde mg/kg hasta concentraciones molares), pero la curva se inclinará hacia el eje y cuando la concentración se aproxime a cero. El límite de cuantificación puede entonces definirse como la región inferior de la curva patrón aún lineal. Las muestras con muy baja concentración pueden ser llevadas al rango lineal añadiendo cantidades conocidas del analito. Durante la validación y verificación debe también asegurarse que se reúnen los requisitos de precisión y veracidad en el rango lineal.
- Los métodos gravimétricos y volumétricos (entre los que se encuentran algunos métodos analíticos importantes como materia seca, ceniza, grasa y nitrógeno Kjeldahl) no requieren la evaluación de la linealidad, pero si el método se utiliza para determinar muy bajas concentraciones debe hallarse entonces el límite de cuantificación.

1.4.3.8. Selectividad

La selectividad o especificidad se define como la capacidad de un método analítico para medir exacta y específicamente el analito, sin interferencia de impurezas u otros componentes que puedan estar presentes en la muestra.

La selectividad es una condición esencial para conseguir una buena exactitud, por lo que constituye un criterio clave en la validación de un método analítico.

La selectividad depende de las características del propio método analítico y de las características de la muestra (matriz) que se analiza.

Mientras más específica sea la reacción o el principio empleado para la determinación, más selectivo será el método, puesto que se evitan reacciones colaterales secundarias. Ahora bien, si la reacción es poco específica, otros compuestos en la muestra serán capaces de reaccionar actuando como interferencias y afectando la exactitud del método.

Por otra parte, la selectividad depende también de las características, naturaleza y composición de la matriz estudiada. No es lo mismo determinar la

concentración de vitamina C en tabletas, una matriz relativamente simple, empleando un método reductimétrico, que determinar vitamina C en un alimento vegetal donde puede existir un conjunto de compuestos reductores que experimenten la misma reacción que el analito y actúen como interferencias. De ahí que un método analítico puede ser muy específico para un tipo de muestra (tabletas) y poco específico para otra matriz (alimento vegetal).

Los elementos antes expuestos, demuestran que, al validar un método de análisis, debe reflejarse claramente no solo el analito que se certifica sino también la matriz para la cual es válida la determinación.

La selectividad se evalúa usualmente a través de la Exactitud (% Recuperación) empleando alguno de los siguientes procedimientos:

1. Se prepara una muestra que contiene los componentes usualmente presentes en la matriz original (alimento), excepto el analito y se procede a la determinación del analito en las condiciones del método evaluado. De forma ideal, ninguno de los componentes presentes debe producir una respuesta cuantificable del instrumento.
2. Se prepara una muestra con un patrón del analito y un componente de las posibles impurezas. Se realiza la cuantificación y se comparan los resultados con una muestra que solo contiene patrón del analito. En este caso hay que aplicar pruebas estadísticas para corroborar la existencia o no de diferencias entre los resultados obtenidos en ambos ensayos.

En resumen, un estudio de selectividad debe asegurar que la señal medida con el método analítico procede únicamente de la sustancia a analizar sin interferencias de otros componentes que estén presentes en la matriz estudiada.

Trabajo Independiente

Consulte los apéndices A-1, A-2, A-3 y A-4, en los que aparece un resumen del presente capítulo.

BIBLIOGRAFÍA

1. Barzola, S, Zumbado, H. (2018). Manual teórico práctico de análisis volumétrico de los alimentos, Editorial Grupo Compás, Guayaquil, Ecuador.
2. Cabrera, A. y Lines, G. (1985). Análisis Instrumental. Métodos ópticos. Tomo I. Ed. Pueblo y Educación, La Habana. Cuba.
3. Colectivo de autores. (1999). Manual de Indicadores Empleados en la Evaluación Sanitaria. Ministerio de Salud Pública. Instituto de Nutrición e Higiene de los Alimentos. La Habana, Cuba.

4. Fon Fay, F, Zumbado, H. (2019). Análisis proximal en alimentos. Fundamentos teóricos y técnicas experimentales. Editorial Coloquium. Ecuador.
5. McLeod, J. A. (1973). Instrumental Methods of Food Analysis. Elek Science. London.
6. NMKL Procedure Nº 4 (1996) Validation of Chemical Analytical Methods. Version 1.
7. Pina, G. y Dorojova, E. (1991). Temas de Análisis Instrumental I. Tomo IV. ENPES. La Habana. Cuba.
8. Sayago, A; Hernanz, D; Gallo, V; Beltrán, R. (2011). Adaptación de las prácticas de Análisis Instrumental al Espacio de Convergencia Europeo. Elaboración de Material Didáctico. Formación Universitaria – Vol. 4 Nº 1.
9. Skoog, D; Holler, F y Nieman, T. (2001). Principios de Análisis Instrumental. Quinta edición. McGraw-Hill/Interamericana de España, S.A.U.
10. Zumbado, H. (2006). Análisis Químico de los Alimentos. Métodos Clásicos. Ed. Félix Varela. La Habana. Cuba.

2 Introducción a los métodos ópticos

Todos los métodos ópticos se basan en la interacción de la radiación electromagnética con las sustancias, de ahí que antes de comenzar su estudio resulta obligado estudiar brevemente las propiedades fundamentales de la radiación electromagnética.

2.1. CARACTERÍSTICAS DE LA RADIACIÓN ELECTROMAGNÉTICA

La radiación electromagnética (REM) es un tipo de energía que se transmite por el espacio a enormes velocidades; adopta muchas formas, siendo la más fácilmente reconocibles la luz y el calor radiante. Manifestaciones menos evidentes son los rayos X, la radiación ultravioleta e infrarroja, las microondas y las ondas de radio.

Las primeras teorías conocidas acerca de la naturaleza de la REM datan del siglo XVII, destacándose las teorías de Huyghens, que consideraba la luz como una onda, y la de Newton, que en 1704 la describió como un flujo de partículas, explicando la reflexión de la luz como los "choques" de esas partículas en un espejo. La reputación que ya poseía este último en la época hizo que mayoritariamente se aceptara la luz como un flujo de partículas.

Dos siglos más tarde (XIX) se logra dar explicación a fenómenos tales como la interferencia, la difracción y la polarización de la luz sobre la base del modelo ondulatorio a través de las aportaciones de Young y Fresnel. En 1860 aparece la teoría de Maxwell del campo electromagnético, que relaciona la óptica con el magnetismo y se determina que la velocidad de propagación de las ondas electromagnéticas en el vacío tiene un valor de 300 000 km/s, lo que concuerda admirablemente con los resultados experimentales. A partir de este momento el modelo ondulatorio gana una preponderancia absoluta sobre el modelo corpuscular.

Sin embargo, a finales del siglo XIX y principios de del XX se detectan fenómenos que no se pueden explicar sobre la base del modelo ondulatorio, tales como: la distribución de intensidades de los espectros de radiación de los sólidos a alta temperatura y el efecto fotoeléctrico

Estos fenómenos lograron explicarse posteriormente sobre la base de modelos que no consideraban el carácter ondulatorio de la luz, sino que más bien lo rechazaban. Así, aparece la teoría cuántica de la luz (Planck, 1900) y la teoría de los fotones de Einstein (1905). Según este último modelo, la luz es un flujo de partículas que se transmite no en forma continua sino en forma discreta como paquetes de energía que Einstein denominó fotones.

Como se observa los estudios sobre la naturaleza de la REM son aparentemente

contradictorios y esta ambigüedad es precisamente la característica esencial que le atribuye a la luz conjuntamente propiedades de onda y de partícula. Esta particularidad de la luz se conoce como *dualidad partícula-onda*.

Hasta el momento no existe una teoría unificada capaz de explicar todos los fenómenos conocidos en que interviene la luz. Las teorías ondulatoria y corpuscular se complementan. Algunos fenómenos se explican correctamente utilizando la teoría ondulatoria, mientras que otros necesitan de la teoría corpuscular para ser analizados satisfactoriamente. El punto de vista moderno es considerar que la luz no es partícula ni es onda; se manifiesta como una o como otra en dependencia de la interacción específica que se esté considerando, y se trabaja para encontrar una teoría que represente mejor sus propiedades.

2.1.1. Propiedades de las ondas

Con diversos fines resulta conveniente considerar la radiación electromagnética como un campo de fuerza eléctrico oscilatorio en el espacio que está acompañado de un campo de fuerza magnético que oscila perpendicularmente.

La figura 2.1 es una representación gráfica del vector eléctrico de una *radiación monocromática polarizada en un plano*, que es tipo más simple de radiación. *Monoromática* significa que la radiación tiene una sola frecuencia y *polarizada en un plano* significa que la oscilación tiene lugar en un plano del espacio y solo en uno.

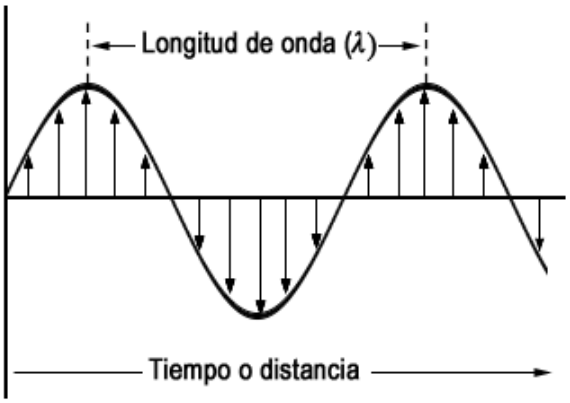


Figura 2.1. Representación de un haz de radiación monocromática polarizada en un plano. Las flechas representan el vector eléctrico.

Los parámetros que caracterizan a la radiación electromagnética como una onda, son los siguientes:

- Longitud de onda (λ). Es la distancia entre dos máximos o dos mínimos sucesivos de una onda. Se expresa en unidades de longitud, siendo las más usuales: nm, cm, y metros.
- Frecuencia (ν). Es el número de oscilaciones del campo por unidad de tiempo, generalmente 1 segundo. Se expresa en hertz (1 Hz = 1 ciclo/s).
- Velocidad de propagación (v). Se define como el producto de la longitud de onda por la frecuencia ($v= \lambda\nu$) y alcanza su valor máximo en el vacío. La

velocidad de la REM en el vacío se representa por *c* y tiene un valor de 2.99792 x 10^{10} cm/s. Así para el vacío:

$c = \lambda\nu \cong 3 \times 10^{10}$ cm/s

La velocidad de la luz en el aire difiere muy poco de c (0.03 % o menos) por lo que en la práctica esta ecuación resulta igualmente aplicable al aire y al vacío.

Queda claro también que los parámetros frecuencia (ν) y longitud de onda (λ) son inversamente proporcionales.

- Número de onda ($\bar{\nu}$). Se define como el número de ondas por unidad de longitud (1 cm) y no es más que el inverso de la longitud de onda siendo sus unidades más frecuentes cm^{-1}.

$$\bar{\nu} = \frac{1}{\lambda}$$

- Potencia radiante (P). La potencia de un haz de radiación es la energía del haz que llega a un área dada por segundo; la intensidad I es la potencia por ángulo sólido unitario. Aunque no es rigurosamente correcto, potencia e intensidad se utilizan a menudo como sinónimos.

Para caracterizar muchas de las propiedades de la radiación electromagnética es conveniente adjudicar una naturaleza ondulatoria a su propagación y describir estas ondas con los parámetros arriba relacionados (velocidad, frecuencia, longitud de onda). Sin embargo el modelo ondulatorio no explica completamente los fenómenos asociados con la absorción o emisión de energía radiante; para estos procesos es necesario considerar la teoría corpuscular.

2.1.2. Propiedades de la radiación considerada como partícula.

En 1905 Einstein postuló que la energía de un haz de radiación no estaba distribuida por el espacio en los campos eléctricos y magnéticos de una onda electromagnética, sino que se encontraba concentrada en pequeños paquetes de energía, a los que denominó fotones o cuantos de energía.

La energía E del fotón es proporcional a la frecuencia de la radiación según:

$$E = h\nu$$

donde *h* es la constante de Planck (6.63 x 10^{-27} ergios/seg)

en términos de longitud de onda quedaría:

$$E = \frac{hc}{\lambda}$$

De aquí que la energía de un fotón es directamente proporcional a la frecuencia e inversamente proporcional a la longitud de onda. Por consiguiente, la energía de un fotón de rayos X ($\lambda \cong 10^{-8}$ cm) es aproximadamente 10 000 veces mayor que la de un fotón emitido por un filamento de tungsteno caliente ($\lambda \cong 10^{-4}$ cm).

La energía de un fotón se expresa usualmente en joule (J), en J/mol o en kJ/mol.

2.2. Espectro electromagnético

En las técnicas espectroscópicas se utilizan diferentes magnitudes para caracterizar las radiaciones, todas ellas relacionadas entre sí. La frecuencia ν (Hz), la energía asociada al fotón o mol de fotones (J, J/mol) y el número de onda $\bar{\nu}$ ((cm^{-1}) son directamente proporcionales mientras que la longitud de onda λ (m, cm, nm) es inversamente proporcional a las anteriores. De acuerdo con estas magnitudes se pueden clasificar a las radiaciones electromagnéticas en diferentes regiones, de fronteras algo imprecisas, donde los procesos moleculares asociados con la absorción o emisión son bien diferentes.

Así, el espectro electromagnético es el conjunto de radiaciones electromagnéticas en sucesión, ordenadas de acuerdo con su frecuencia.

En la figura 2.2 y la tabla 2.1 se muestran las diferentes regiones del espectro electromagnético y el rango de longitudes de ondas y frecuencias correspondientes a cada una de ellas.

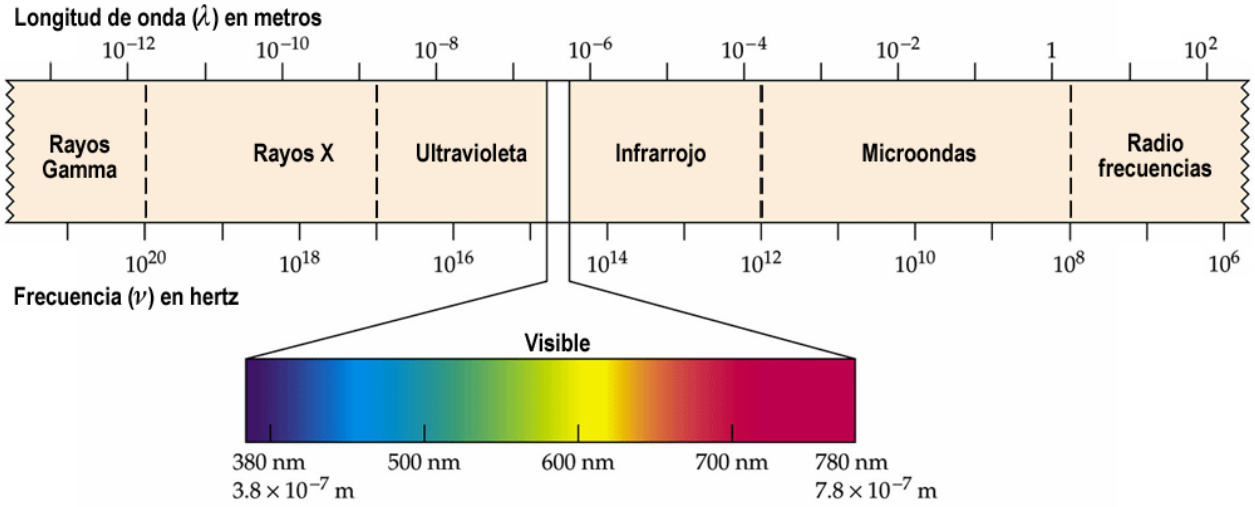


Figura 2.2. Regiones del espectro electromagnético.

Tabla 2.1. Características de las diferentes regiones del espectro electromagnético.

Región	Energía (J/mol)	Frecuencia ν (Hz)	Longitud de onda λ	
			cm	Unidades usuales
Rayos gamma	-	$> 3.10^{20}$	$> 1.10^{10}$	> 100 Aº
Rayos X	≅ miles kJ/mol	$3.10^{17} - 3.10^{20}$	$1.10^{10} - 1.10^{7}$	10^{2} – 10 Aº
Ultravioleta	≅ decenas kJ/mol	$8.10^{14} - 3.10^{17}$	$1.10^{7} - 4.10^{5}$	1 – 200 nm
Visible	≅ decenas kJ/mol	$4.10^{14} - 8.10^{14}$	$4.10^{5} - 8.10^{5}$	400 – 800 nm
Infrarrojo	≅ miles J/mol	$1.10^{12} - 4.10^{14}$	$8.10^{5} - 3.10^{2}$	1 – 300 μm

Región	Energía (J/mol)	Frecuencia ν (Hz)	Longitud de onda λ	
			cm	Unidades usuales
Microondas	≅ decenas J/mol	3.10^8 – 1.10^{12}	3.10^2 – 100	0.03 – 100 cm
Radiofrecuencias	hasta 1 J/mol	3.10^5 – 3.10^8	100 – 10^5	1 – 1000 m

Obsérvese que el rango de longitudes de onda del visible (únicas radiaciones capaces de ser detectadas por el ojo humano) solo abarcan una pequeña zona del espectro electromagnético (≅ 400 – 800 nm).

2.3. INTERACCIÓN DE RADIACIÓN ELECTROMAGNÉTICA CON LA MATERIA

Cuando la radiación pasa desde el vacío a la superficie de una porción de materia, el vector eléctrico de la radiación interacciona con los átomos y moléculas del medio. La naturaleza de esta interacción depende de las propiedades de la materia y puede dar lugar a procesos de absorción, emisión, refracción y desviación del plano de luz linealmente polarizada, entre otros fenómenos.

2.3.1. Absorción de radiación electromagnética

Cuando pasa una radiación a través de una capa transparente de un sólido, líquido o gas, parte de esta radiación, de determinada frecuencia, puede ser absorbida por la materia. En este caso, la energía electromagnética se transfiere a los átomos o moléculas que constituyen la muestra y como resultado, estas partículas pasan del estado de más baja energía o *estado fundamental* a estados de mayor energía o *estados excitados*. A temperatura ambiente la mayoría de las sustancias se encuentran en su nivel energético más bajo, o sea en *estado fundamental*. La absorción de radiación es por lo tanto una absorción de energía que produce una transición entre el estado fundamental y estados de mayor contenido energético (figura 2.3).

Ahora bien, los átomos, moléculas e iones tienen un número limitado de niveles de energía; estos niveles están cuantizados y para pasar de uno a otro la molécula experimenta un cambio brusco que implica una cantidad definida de energía a aceptar o ceder al medio en que se encuentra; entonces para que se produzca absorción de radiación, la energía del fotón excitante debe igualar la diferencia de energía entre el estado fundamental (E_0) y uno de los estados excitados (E_1, $E_{2, \dots}$ E_n) de la especie absorbente, según:

$$E_n - E_0 = \Delta E = h\nu$$

Esta relación es conocida como condición de frecuencia de Bohr y vincula a la frecuencia (ν) de la radiación capaz de inducir la transición entre los estados del sistema con la diferencia de energía entre los mismos (figura 2.3).

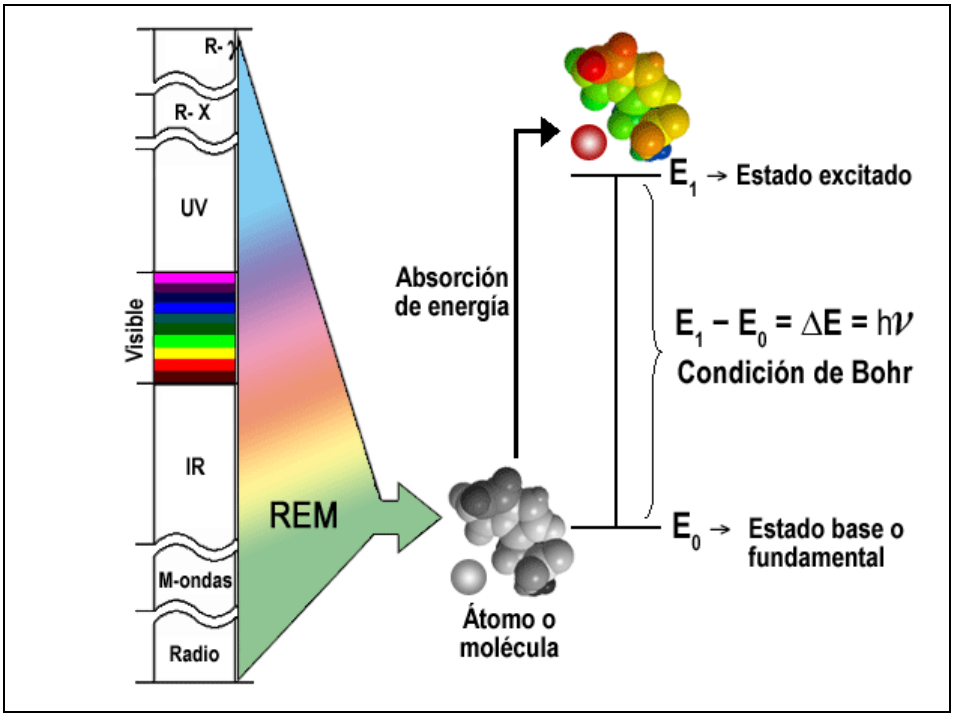


Figura 2.3. Representación esquemática del proceso de absorción de radiación.

Las diferencias de energía entre los diferentes niveles energéticos son únicas para cada especie y dependen de su estructura, ello significa que cada sustancia absorbe radiación de diferente energía y longitud de onda. Así mismo, un estudio de las frecuencias de radiación absorbida, ofrece un medio para caracterizar a los constituyentes de una muestra de materia.

2.3.1.1. Espectros de absorción

Un espectro de absorción se obtiene al someter una muestra a un barrido de radiación electromagnética de diferentes longitudes de onda. Así, un espectro de absorción nos permite conocer como una sustancia absorbe selectivamente radiación de diferente contenido energético (diferente frecuencia y diferente longitud de onda), lo cual dependerá de sus niveles energéticos que a su vez están determinados por su estructura química.

La manera más usual de representar un espectro de absorción es mediante un gráfico en cuya abscisa (eje X) se representa una magnitud de la radiación (frecuencia, longitud de onda, numero de onda) y en la ordenada (eje y) se describe la intensidad de la absorción por la sustancia (Absorbancia, % de transmitancia). La figura 2.4 Muestra los espectros de absorción de la molécula de vitamina E y del hierro en estado atómico.

Nótese la marcada diferencia del aspecto general de ambos espectros. Mientras el espectro de absorción molecular se caracteriza por presentarse en forma de bandas cubriendo una amplia gama de longitudes de ondas, el espectro de absorción atómica se presenta en forma de líneas, correspondientes a unas pocas frecuencias. Las razones de estas diferencias se explican en los próximos epígrafes.

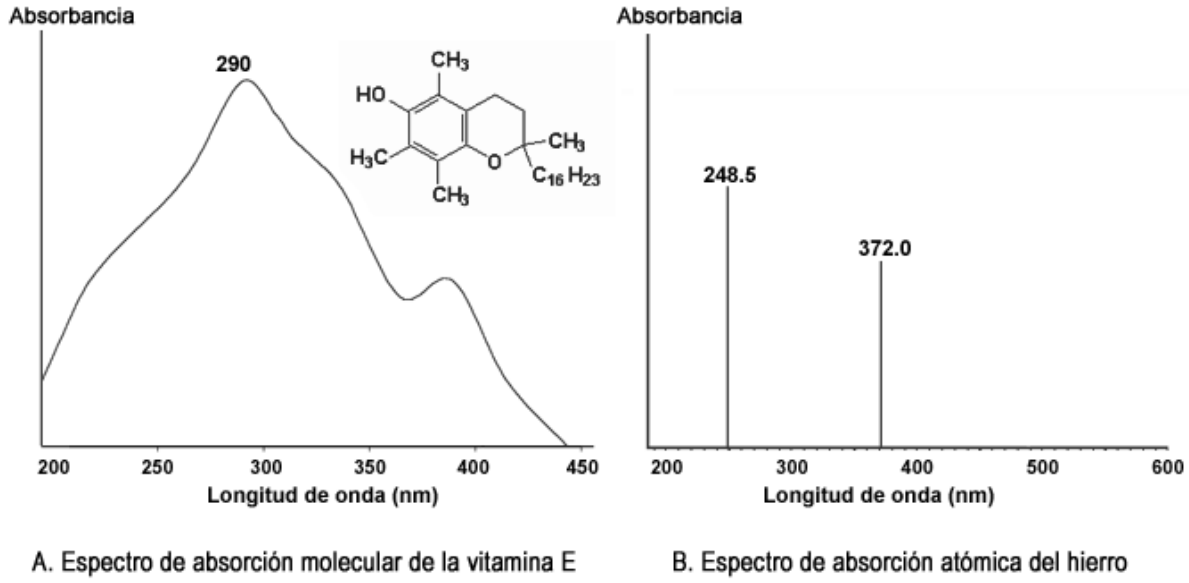


Figura 2.4. Espectros de absorción molecular y atómica en las regiones UV y visible.

2.3.1.2. Absorción atómica

Cuando se hace pasar radiación policromática ultravioleta o visible a través de un medio formado por partículas monoatómicas, como por ejemplo vapores de sodio, se produce absorción solo en unas pocas frecuencias bien definidas. La relativa simplicidad de estos espectros se debe se debe a que el posible número de estados energéticos de los átomos es pequeño. La excitación tiene lugar solamente por procesos electrónicos, en los que uno o más de los electrones del átomo se elevan a un nivel de energía más alto. Así por ejemplo, para el caso del sodio la excitación del electrón 3s al estado 3p requiere una energía correspondiente a una longitud de onda de 589.2 nm (luz amarilla), de ahí que el espectro de absorción para el vapor de sodio conste de un pico estrecho a este valor de λ.

La radiación ultravioleta y visible tiene suficiente energía para causar transiciones de los electrones más externos, llamados también electrones de enlace, mientras que las frecuencias de los rayos X son mas energéticas y pueden interaccionar con los electrones más cercanos a los núcleos de los átomos y producir espectros con picos de absorción correspondientes a transiciones electrónicas de los electrones más interiores.

Cualquiera que sea la longitud de onda, los espectros de absorción atómica constan de un número limitado de picos muy estrechos (espectro de líneas), debido al reducido número de niveles energéticos de los átomos.

2.3.1.3. Absorción molecular

La absorción por moléculas poliatómicas es un proceso considerablemente más complejo que la absorción atómica, debido al gran número de estados

energéticos que poseen las moléculas. La energía total de una molécula está dada por:

$E_{TOTAL} = E_{ELECTRÓNICA} + E_{VIBRACIONAL} + E_{ROTACIONAL}$

donde

$E_{ELECTRÓNICA}$ describe la energía de los electrones de una molécula.

$E_{VIBRACIONAL}$ se refiere a la energía de la molécula relacionada con las diferentes vibraciones de los átomos enlazados entre si y que involucran cambios en las distancias interatómicas y n los ángulos de enlace.

$E_{ROTACIONAL}$ designa la energía asociada con la rotación de la molécula alrededor de su centro de gravedad.

Para cada estado electrónico de una molécula hay normalmente varios estados vibratorios posibles y a su vez, para cada uno de estos existen numerosos estados rotatorios. Como consecuencia, el número de posibles niveles de energía de una molécula es grande y por tanto es también grande el número de diferentes longitudes de ondas que puede absorber.

En la figura 2.5 Se muestra una representación gráfica de las energías asociadas con unos pocos estados electrónicos, vibratorios y rotatorios de una molécula.

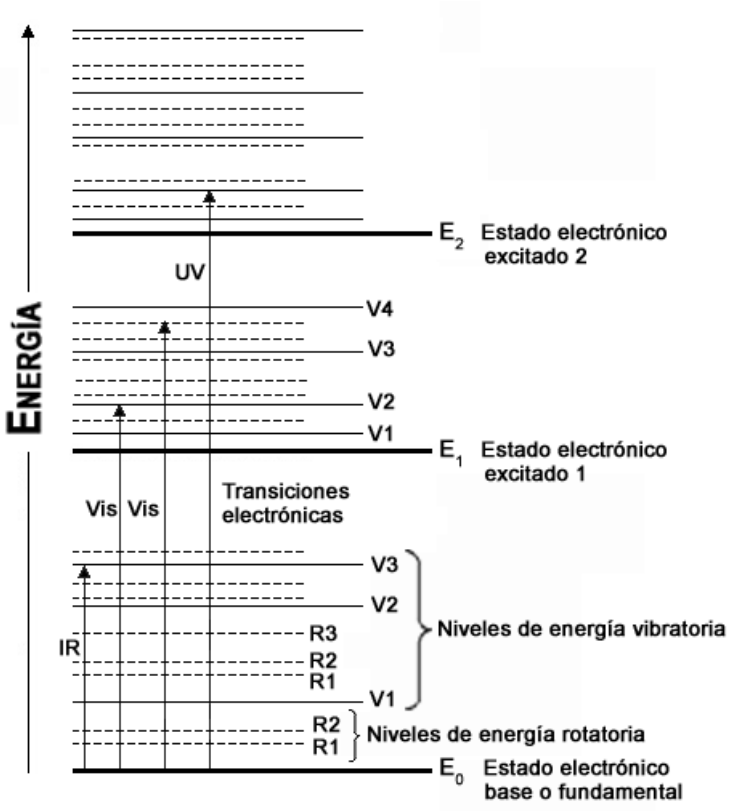


Figura 2.5. Diagrama parcial de los niveles energéticos para una molécula.

La línea gruesa marcada E_0 representa la energía electrónica de una molécula en el estado base o fundamental) el estado de menor energía electrónica) mientras que las líneas marcadas E_1 y E_2 representan las energías de dos estados

electrónicos excitados. Nótese que cada nivel electrónico tiene asociado numerosos niveles vibracionales (líneas finas), los cuales a su vez involucran varios niveles rotacionales (líneas discontinuas). Obsérvese además que las diferencias de energía entre el estado fundamental y un estado electrónicamente excitado son mucho mayores que las existentes entre los distintos niveles vibratorios de un estado electrónico dado.

En esta misma figura (¿?) se representan con flechas algunas de las transiciones que se producen como consecuencia de la absorción de radiación. Así por ejemplo, la radiación proveniente del infrarrojo (IR) medio y cercano, que es poco energética, no resulta suficiente para producir un salto electrónico y solo puede dar lugar a transiciones entre los distintos niveles vibratorios del estado fundamental.

Sin embargo la radiación proveniente de las zonas del visible y el ultravioleta (UV) son más energéticas y provocan la excitación de un electrón desde E_0 hasta cualesquiera de los niveles vibratorios asociados con E_1 e incluso hasta E_2 si se trata de radiación UV lo suficientemente energética.

Obviamente, para producir transiciones rotatorias puras se requerirá una energía muy pequeña correspondiente con frecuencias de las regiones de IR lejano y las microondas. Así mismo, radiaciones fuertemente energéticas como las del UV lejano y los rayos X pueden producir ionización de la molécula y cambios importantes en el interior electrónico.

En la tabla 2.2 Se presenta un resumen de los principales procesos que pueden ocurrir en moléculas y átomos por absorción de radiación de diferentes regiones del espectro electromagnético.

Tabla 2.2. Procesos que pueden ocurrir en átomos y moléculas por absorción en dependencia de la energía de la radiación

PROCESO	ESPECIE QUE ABSORBE	REGIÓN DEL ESPECTRO
Cambios en el interior electrónico	Moléculas y átomos	Rayos X
Ionización	Moléculas	UV lejano
Cambios en las afueras electrónicas	Moléculas y átomos	UV cercano y visible
Vibración	Moléculas	IR cercano y medio
Rotación	Moléculas	IR lejano y microondas

A diferencia de los espectros de absorción atómica que consisten en un conjunto de líneas netas y bien definidas, los espectros moleculares en las regiones del UV y el visible se presentan como bandas de absorción que suelen abarcar un intervalo considerable de longitudes de onda debido al gran número de posibilidades de transiciones electrónicas que posee una molécula, por cuanto con cada transición electrónica se asocian varias líneas de absorción

estrechamente agrupadas por la existencia de numerosos estados vibratorios que incluyen a su vez niveles de energía rotatoria.

En la región del infrarrojo (IR) los espectros poseen un mayor números de bandas puesto que en esta zona se detectan los diferentes modos de vibración de la molécula (recordar que la energía del IR no es suficiente para provocar transiciones electrónicas y solo conducen a transiciones de los estados vibratorios). En este caso el espectro se presenta como número de ondas (10000-200cm^{-1}) vs. Transmitancia.

2.3.2. Emisión de radiación electromagnética

La emisión de radiación es un fenómeno estrictamente inverso a la absorción. A menudo se produce emisión de radiación cuando las partículas excitadas (moléculas, átomos, iones) retornan a niveles de energía más baja o a su estado fundamental. La excitación puede producirse por diferentes medios, entre ellos, el bombardeo con electrones u otras partículas elementales, la exposición a chispas de corriente alterna de alto potencial, el tratamiento térmico en una llama o por absorción de radiación electromagnética. La figura 2.6 muestra una representación esquemática de este proceso.

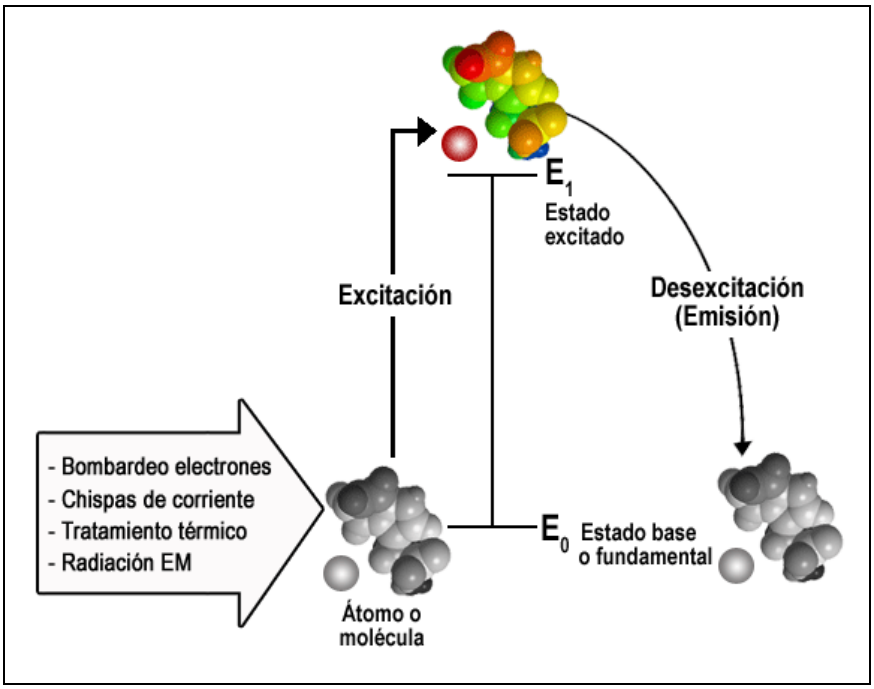


Figura 2.6. Representación esquemática del proceso de emisión de radiación

De forma análoga a como ocurre en los espectros de absorción, los espectros de emisión atómica se presentan en forma de líneas (espectro discontinuo) mientras las moléculas producen espectros de bandas (espectro continuo).

2.3.2.1. Fluorescencia y fosforescencia.

La fluorescencia y la fosforescencia constituyen procesos de emisión en los que los átomos o moléculas se excitan por absorción de radiación electromagnética. Cuando las especies excitadas retornan al estado fundamental tiene lugar la

emisión de radiación.

La fluorescencia ocurre mucho más rápidamente que la fosforescencia y por lo general se ha completado aproximadamente después de 10^{-5} segundos (o menos) a partir del momento de la excitación. Por su parte, la fosforescencia se mantiene por un período mayor de tiempo y puede continuar durante varios minutos y horas después de haber cesado la radiación excitante.

La *fluorescencia de resonancia*, se refiere se refiere a un proceso en el que la radiación emitida tiene la misma frecuencia (y longitud de onda) que la radiación absorbida. En este caso la especie se excita desde el estado base (E_0) a un estado energético E_1 o E_2 por efecto de una radiación incidente de contenido energético ($E_1 - E_0$) o ($E_2 - E_0$). Después de un breve período se produce la emisión de radiación de idéntica energía. La fluorescencia de resonancia se produce generalmente por átomos en estado gaseoso, debido a que los mismos no poseen estados energéticos vibratorios asociados a los estados energéticos electrónicos (recordar que lo átomos solo tienen estados electrónicos).

La *fluorescencia no resonante* se produce como resultado de la emisión de radiación por moléculas en solución (o en estado gaseoso) y presenta la característica de que la radiación emitida es, generalmente, de menor contenido energético que la absorbida. Como ya se ha explicado, las moléculas poseen un conjunto de estados vibratorios asociados a los estados electrónicos excitados. Así, la excitación de una molécula por absorción de radiación UV-vis conduce al tránsito hacia alguno de los diferentes niveles vibratorios de un estado electrónico excitado (ver figura 2.5), sin embargo, los tiempos de permanencia en estos estados vibratorios son instantáneos ($\cong 10^{-15}$ segundos) e inmediatamente se produce una relajación hacia un nivel vibratorio más bajo dentro del estado electrónico excitado, en el cual la energía se pierde en forma de calor; a partir de aquí, hay una desexcitación hasta el estado fundamental E_0 con la consecuente emisión de radiación electromagnética de menor energía y mayor longitud de onda.

La figura 2.7 muestra un esquema de los procesos de fluorescencia resonante y no resonante.

2.3.3. Refracción de radiación

Cuando la radiación incide con un determinado ángulo en la interfase entre dos medios transparentes que tienen densidades diferentes, se observa un cambio brusco en la dirección del haz como consecuencia de una diferencia en la velocidad de la radiación en los dos medios. A esta desviación se le denomina refracción.

Cuando el haz pasa de un medio menos denso a uno más denso, como en la figura 2.8, la desviación se acerca a la normal. Cuando pasa de un medio más denso a otro menos denso, se observa una desviación separándose de la normal.

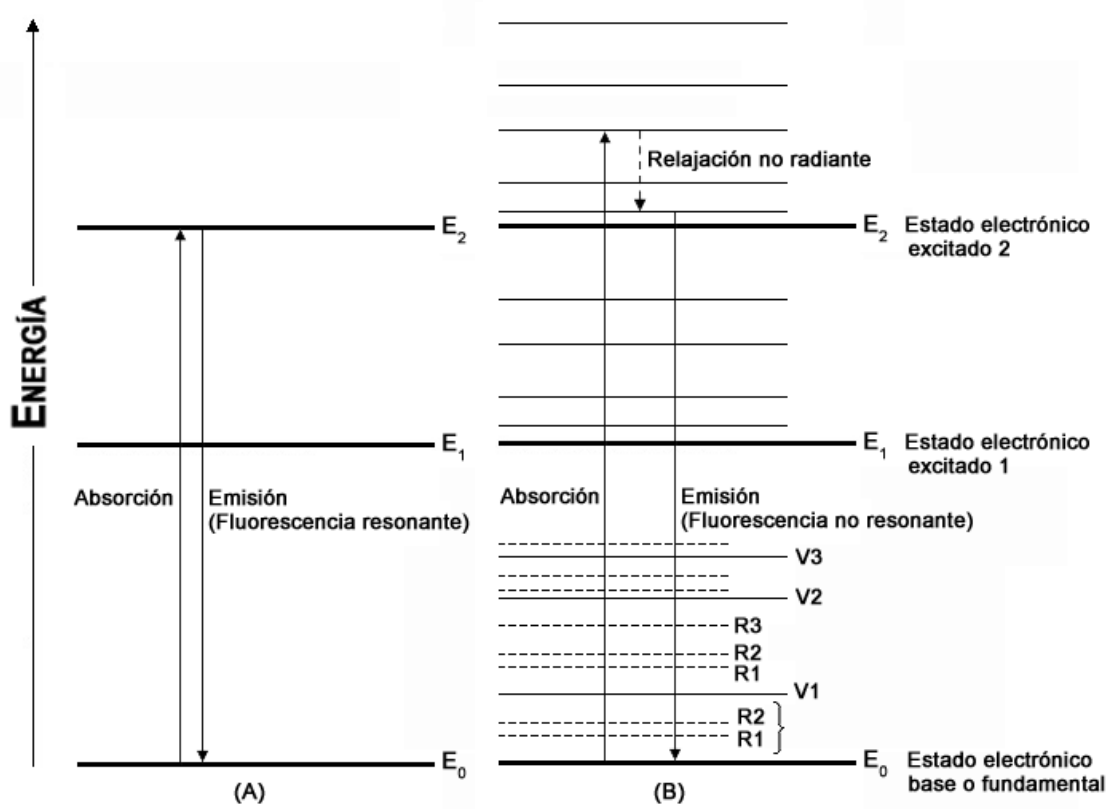


Figura 2.7. Procesos de emisión. (A). Fluorescencia resonante, característica de los procesos de emisión atómica, en la que se emite una radiación de igual frecuencia que la absorbida. (B). Fluorescencia no resonante, característica de los procesos de emisión molecular, en la generalmente se emite una radiación de menor frecuencia (mayor longitud de onda) que la absorbida, debido a fenómenos de relajación vibratoria.

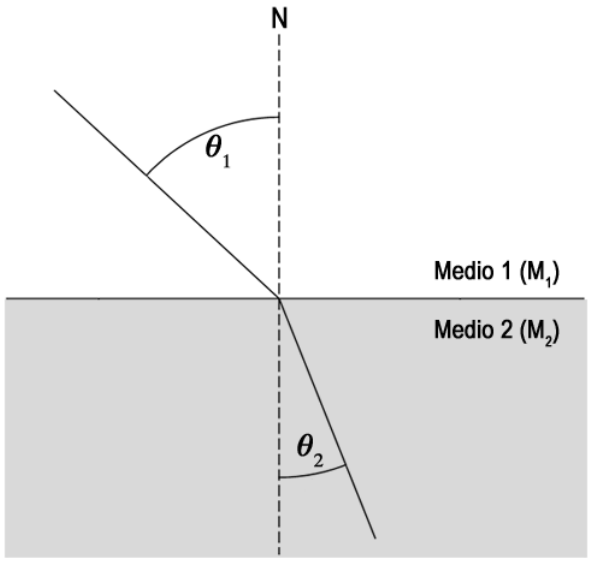


Figura 2.8. Refracción de la luz al pasar del medio M_1 menos denso al medio M_2 más denso en el cual su velocidad es menor

El índice de refracción (η) de un medio es entonces una medida de su interacción con la radiación y se define como:

$$\eta_i = \frac{c}{v_i} \qquad (2.1)$$

donde

η_i es el índice de refracción para una frecuencia *i* determinada
v_i es la velocidad de la radiación en el medio
c es la velocidad de la radiación en el vacío

La magnitud de la refracción viene dada por la ley de Snell:

$$\frac{sen\ \theta_1}{sen\ \theta_2} = \frac{\eta_2}{\eta_1} = \frac{v_1}{v_2} \qquad (2.2)$$

donde v_1 y v_2 son las velocidades del haz de radiación en el medio 1 y en el medio 2 respectivamente.

Si M_1 en la figura 2.7 representa el vacío, v_i se iguala a c (velocidad de la luz en el vacío), y η_i es la unidad (véase ecuación 2.1); después de reordenar la ecuación 2.2, se simplifica a:

$$(\eta_2)_{vacío} = \frac{(sen\ \theta_1)_{vacío}}{sen\ \theta_2}$$

Los índices de refracción de la sustancia M_2 pueden calcularse, por tanto, a partir de las medidas de $(\theta_1)_{vacío}$ y de θ_2. Por conveniencia, los índices de refracción se suelen medir y escribir tomando el aire como referencia más que el vacío. Entonces el índice de refracción viene dado por:

$$(\eta_2)_{aire} = \frac{(sen\ \theta_1)_{aire}}{sen\ \theta_2}$$

La mayoría de las tablas de índice de refracción proporcionan los datos con respecto al aire y no al vacío. Dichos datos se transforman fácilmente en índices de refracción respecto al vacío multiplicándolos por el índice de refracción del aire respecto al vacío, o sea, $\eta_{vacío} = 1{,}00027\ \eta_{aire}$ pero esta conversión rara vez se usa en la práctica debido a la similitud de los índices de refracción de las sustancias con respecto al aire y al vacío.

Los principios de la refracción de la radiación son empleados en la aplicación de un método instrumental conocido como *refractometría*, el cual será abordado con detalle en el capítulo 7 de este texto.

2.3.4. Polarización de la radiación

La radiación electromagnética puede ser considerada como una onda transversal donde las direcciones de los vectores vibratorios eléctricos y magnéticos deben ser normales a la dirección de propagación.

La radiación que se propaga en una dirección dada consiste en trenes de onda cuyos planos de vibración están orientados al azar con respecto a la dirección de propagación. Esta radiación es *no polarizada* y pudiera representarse tal y como aparece en la figura 2.9a. Por el contrario, si se logra obtener una radiación

donde el vector intensidad de campo vibre en una sola dirección, se dice que la radiación está *polarizada en un plano* (figura 2.9b)

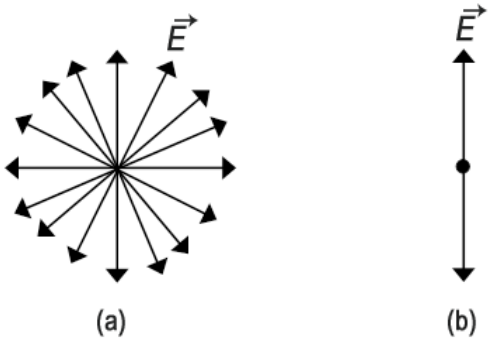


Figura 2.9. (a) *Una onda transversal no polarizada que se mueve hacia el lector, vista como una superposición al azar de muchos trenes de ondas polarizados****, (b)*** *Una onda transversal polarizada en un plano. En ambas figuras se muestra solo el vector eléctrico* ***(*** $\vec{E}$ ***)*****.**

La radiación electromagnética polarizada en un plano se produce en ciertas fuentes de energía radiante. Por ejemplo, tanto las ondas de radio procedentes de una antena como las microondas producidas por un tubo klistrón están polarizadas en un plano. También está polarizada la radiación visible y ultravioleta procedente de la relajación de un único átomo o molécula excitados, pero el haz de este tipo de fuente no presenta una polarización neta, ya que está constituido por una multitud de trenes de ondas individuales originados por un número enorme de procesos atómicos o moleculares individuales. El plano de polarización de estas ondas individuales es aleatorio, por lo que se anulan sus polarizaciones individuales.

La radiación polarizada ultravioleta y visible se produce por el paso de radiación a través de medios que absorben, reflejan o refractan de forma selectiva la radiación que vibra en un solo plano.

Ahora bien, existen dispositivos comerciales, como las láminas polarizadoras y los prismas de Nicol que tienen la función de producir radiación linealmente polarizada.

En la figura 2.10 se muestra la radiación no polarizada que llega a una lámina polarizadora, en la cual existe una cierta dirección característica de polarización, que se muestra con las líneas paralelas. La lámina permite únicamente el paso de aquellos componentes de la onda electromagnética cuyos vectores eléctricos ($\vec{E}$) vibren paralelamente a esta dirección y absorben todas aquellas que vibran perpendicularmente. Como resultado, la luz que sale del dispositivo está linealmente polarizada en un plano ya que el vector eléctrico ($\vec{E}$) vibra en un solo plano, perpendicular a la dirección de propagación.

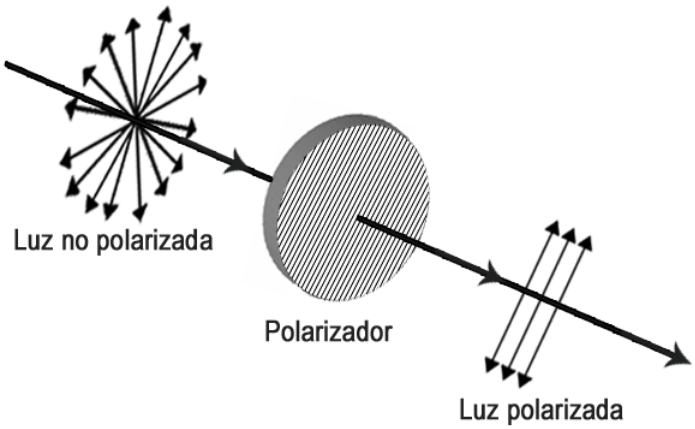


Figura 2.10. Una lámina polarizadora transforma la luz no polarizada en luz polarizada en un plano.

Existen sustancias capaces de desviar el plano de la luz linealmente polarizada y se han elaborado métodos de análisis para su identificación y cuantificación basados en este principio. Estos métodos son conocidos como métodos polarimétricos o polarimetría y serán tratados con profundidad en el capítulo 7.

2.4. CLASIFICACIÓN DE LOS MÉTODOS ÓPTICOS

Los métodos ópticos se clasifican en función de la naturaleza de la interacción de la radiación electromagnética con la materia.

La tabla 2.3 muestra un resumen de los métodos que serán tratados en este texto.

Tabla 2.3. Algunos métodos ópticos de amplio uso en la actualidad

Proceso	Método	Especie analizada	Región del espectro
Absorción de radiación	Espectrometría de absorción molecular	Moléculas	UV-visible
	Espectrometría de absorción atómica	Átomos	UV-visible
Emisión de radiación	Fluorometría	Moléculas	UV-visible
	Emisión atómica	Átomos	UV-visible
Refracción de radiación	Refractometría	Moléculas	UV-visible
Polarización de radiación	Polarimetría	Moléculas	UV-visible

BIBLIOGRAFÍA

1. Bermejo, R; Moreno, A. (2014). Análisis Instrumental. Editorial Síntesis S. A. Madrid.

2. Cabrera, A. y Lines, G. (1985). Análisis Instrumental. Métodos ópticos. Tomo I. Ed. Pueblo y Educación, La Habana. Cuba.

3. Cano, B. (2018). Guía de laboratorio de Análisis Instrumental. Corporación Universitaria Rafael Núñez.
4. Fernández, L; Rojas, L; Lapo, B. (2015). Desarrollos experimentales en Análisis Instrumental. Ediciones UTMACH.
5. McLeod, J. A. (1973). Instrumental Methods of Food Analysis. Elek Science. London.
6. Pina, G. y Dorojova, E. (1991). Temas de Análisis Instrumental I. Tomo IV. ENPES. La Habana. Cuba.
7. Rubinson, K & Rubinson, J. (2001). Análisis Instrumental. Pearson Educación SA. Madrid.
8. Sayago, A; Hernanz, D; Gallo, V; Beltrán, R. (2011). Adaptación de las prácticas de Análisis Instrumental al Espacio de Convergencia Europeo. Elaboración de Material Didáctico. Formación Universitaria – Vol. 4 Nº 1.
9. Sierra, M; Gómez, S; Morante, S; Pérez, D; Sanchez, A; Gañan, J. (2015). Análisis Instrumental. Experiencia de Innovación Docente en la URJC. Ed. Dykinson. Madrid.
10. Skoog, D; Holler, F y Nieman, T. (2001). Principios de Análisis Instrumental. Quinta edición. McGraw-Hill/Interamericana de España, S.A.U.
11. Skoog, D; Holler, J; Crouch, S. (2008). Principios de análisis instrumental. 6ta ed. Cengage Learning Editores.

3 Espectrometría de absorción molecular ultravioleta y visible

Aunque el descubrimiento de la dispersión de la luz por Newton data de 1704 el desarrollo de las técnicas experimentales en este campo fue muy lento. Sólo más de un siglo después Fraunhofer creó un sistema óptico, que mediante uso de prismas y rendija (slit), permitió detectar en el espectro de la luz solar las líneas de absorción que llevan su nombre. El conocimiento de que cada elemento químico posee un espectro de emisión de líneas característica se debe a Bunsen y Kirchhoff (1859), que pueden considerarse los fundadores del análisis espectral y los primeros que construyeron un equipo capaz de ser utilizado prácticamente. Mientras que la Espectroscopia de Emisión Atómica poseía ya a fines del siglo XIX aplicaciones prácticas, en especial para la determinación de metales en minerales, la Espectroscopia de Absorción Molecular en las regiones Ultravioleta y Visible sólo alcanzó desarrollo a partir de los años 30 del siglo XX. El desarrollo de sistemas de detección fotoeléctrica permitió en los años 40 la sustitución de los equipos de detección fotográfica, poco eficientes, y la generalización de esta técnica espectroscópica.

3.1. Regiones del espectro Ultravioleta-Visible.

La región del espectro electromagnético que corresponde a las transiciones que involucran a electrones de la capa de valencia se extiende por longitudes de onda de 100 a 800 nm (regiones ultravioleta y visible), aunque no toda esta zona es de igual utilidad para la elucidación de estructuras orgánicas. La región UV-visible puede dividirse en tres zonas fundamentales:

Ultravioleta lejano: Se ubica desde 1 hasta 200 nm, y presenta características que hacen complicada su utilización:

- En esta zona absorben las moléculas componentes del aire, lo que hace imprescindible trabajar con equipos evacuados (de aquí el nombre alternativo de la región: Ultravioleta de vacío).
- Los materiales usuales para la construcción de componentes ópticos (celdas, lentes, elementos dispersivos), el cuarzo y el vidrio, absorben fuertemente en esta zona. Se requiere trabajar con otros materiales, menos versátiles y más costosos (LiF, CaF_2, zafiro, utilizables hasta 115, 125 y 140 nm respectivamente).
- Los solventes absorben fuertemente en esta región. Los hidrocarburos saturados pueden usarse hasta 170 nm, los hidrocarburos perfluorados hasta 150 nm.
- La sensibilidad de los detectores es generalmente baja.

- La absorción en esta zona es poco selectiva pues casi todos los compuestos presentan absorción en esta región.

Ultravioleta cercano. Comprende la región entre 200 y 400nm, es de gran utilidad en la determinación estructural de insaturación conjugada, aromaticidad o de ciertos grupos insaturados con pares electrónicos libres (carbonilo, nitro, etc.), sin presentar los serios inconvenientes del Ultravioleta de vacío. Se requieren materiales ópticos de cuarzo si se quiere acceder a la zona de longitudes de onda inferiores a 350nm, mientras que el vidrio es utilizable en el resto de la región Ultravioleta cercana y toda la región visible.

Región Visible. Abarca de 400 hasta cerca de 800nm, es la única del espectro electromagnético detectable por el ojo humano. Las transiciones que se presentan en esta zona corresponden a transiciones electrónicas de muy baja energía. Todos los compuestos coloreados absorben selectivamente en esta región. Los compuestos fuertemente conjugados y ciertos complejos de metales de transición absorben significativamente en la región.

Ciertas transiciones electrónicas pueden presentarse a longitudes de onda superiores a 800 nm, pero estas no son comunes en los compuestos orgánicos.

En la figura 3.1 se muestra la región Ultravioleta Visible del espectro electromagnético, así como sus características.

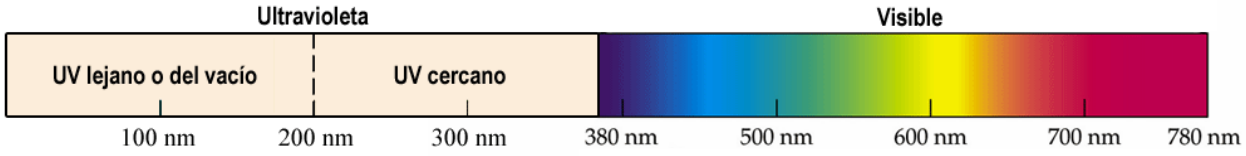


Figura 3.1. Regiones Ultravioleta y Visible del espectro electromagnético.

3.2. CARACTERÍSTICAS DE LOS ESPECTROS DE ABSORCIÓN EN LA REGIÓN UV-VISIBLE

Las transiciones electrónicas en moléculas se presentan en forma de bandas, como ya se vio anteriormente, con modificación simultanea de los niveles de energía vibracionales y rotacionales. En moléculas pequeñas en fase gaseosa es posible observar la estructura fina vibracional de las bandas electrónicas con subestructura rotacional no bien resuelta. En moléculas más complejas la multiplicidad de los niveles vibracionales hace que el gran número de transiciones de similar energía produzca bandas de absorción continuas sin estructura fina vibracional evidente. Esto es también lo usual cuando se registran los espectros de absorción UV en fases condensadas (soluciones, sólidos).

Las principales características de una banda de absorción en el UV-Visible son: la posición del máximo, la intensidad y la anchura.

La posición de una banda, dada por la posición del máximo de absorción, depende de la energía de la transición (relación de Bohr) y se reporta

usualmente como longitud de onda máxima (λ_{max}), expresada en nm. El valor de λ_{max} expresa la frecuencia de radiación absorbida por un mayor número de moléculas de la especie absorbente. En los espectros de absorción UV-vis se presenta como uno o varios máximos en la banda de absorción.

La intensidad de una banda de absorción puede expresarse como la absortividad molar (o coeficiente de extinción molar) en el valor de λ_{max}. Esta intensidad depende del cuadrado del momento dipolo de la transición (cambio en la distribución de cargas eléctricas durante la transición). Se producen absorciones intensas cuando una transición es acompañada por un gran cambio en la distribución de cargas (ε_{max} del orden de 10^4), mientras que las transiciones con pequeño cambio en la distribución de cargas producen débiles bandas de absorción (ε_{max} del orden de 10^2 o inferiores). Dados los valores típicos de las absortividades molares en el UV, es común trabajar con soluciones de concentraciones 10^{-3} a 10^{-5} mol/L.

La **anchura de una banda de absorción electrónica** depende del número e intensidad de los componentes vibracionales de la transición correspondiente. La distribución de intensidades entre los componentes vibracionales de una transición electrónica depende de los cambios en la geometría de equilibrio de los estados base y excitados.

La figura 3.2 muestra el espectro de absorción característico de la vitamina A

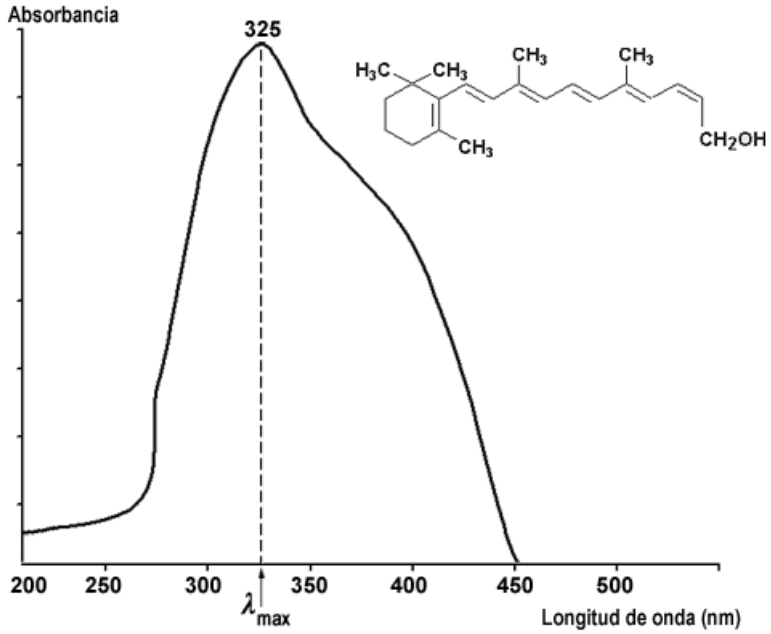


Figura 3.2. Espectro de absorción del Retinol

3.3. LEYES QUE RIGEN LA ABSORCIÓN

Cuando un haz de radiación monocromática de potencia P_0 atraviesa una solución de sustancia contenida en un recipiente, el haz de radiación emergente posee generalmente menor potencia que el incidente. Esta disminución de potencia se

debe a la descomposición del haz incidente el cual puede experimentar fenómenos de refracción, reflexión, dispersión y absorción por la solución de sustancia (figura 3.3)

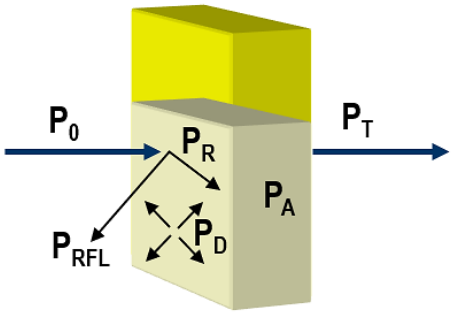


Figura 3.3. Fenómenos que ocurren cuando un haz de radiación electromagnética incide sobre una solución de sustancia contenida en un recipiente *(P_0= Potencia incidente, P_{RFL}= Potencia reflejada, P_{RFR}= Potencia refractada, P_D= Potencia dispersada, P_A= Potencia Absorbida, P_T= Potencia transmitida).*

Así, la potencia de la radiación incidente P_0 puede representarse como la suma de la potencias de los fenómenos involucrados, según:

$$P_0 = P_{REFLEJADA} + P_{REFRACTADA} + P_{DISPERSADA} + P_{ABSORBIDA} + P_{TRANSMITIDA}$$

Los fenómenos de reflexión y refracción son pequeños en comparación con la absorción y pueden ser compensados realizando un ensayo en blanco, es decir haciendo mediciones utilizando un recipiente idéntico que solo contiene el disolvente de la muestra. Por otra parte, la dispersión se elimina garantizando la ausencia de partículas dispersas en la solución de muestra.

Bajo estas condiciones, la disminución de la potencia del haz emergente P_t ($P_{TRANSMITIDA}$) en relación con el incidente P_0, se debe a que la sustancia a absorbido radiación electromagnética, es decir, como consecuencia de las interacciones entre los fotones del haz incidente y las partículas absorbentes de la sustancia, la potencia P_0 disminuye a P_t, entonces:

$$P_0 = P_{ABSORBIDA} + P_{TRANSMITIDA}$$

A partir de esta afirmación se pueden definir los siguientes términos:

Transmitancia.

La transmitancia T de una solución es la relación entre la potencia transmitida P_t y la incidente P_0, según:

$$T = \frac{P_t}{P_0}$$

Por lo general la transmitancia se expresa como porcentaje y entonces tendíamos:

$$\%T = \frac{P_t}{P_0} 100$$

Obviamente T puede tomar valores entre 0 y 1, y en la medida que se aleje del valor unitario la absorción de radiación por la sustancia es mayor.

Absorbancia.

La absorbancia (también conocida como densidad óptica o extinción) de una solución está definida por la ecuación:

$$A = -\log T = \log \frac{P_0}{P_t}$$

Estudios realizados por Lambert (1729) y Bouguer (1760) demostraron la existencia de una relación directamente proporcional entre la absorbancia y la longitud del paso óptico que atravesaba la radiación al incidir sobre la solución de sustancia contenida en un recipiente. Casi un siglo más tarde, Beer y Bernard (1852) encontraron que la potencia de la radiación monocromática transmitida (P_t) decrecía con el aumento de la concentración, es decir la absorbancia aumentaba de forma similar a como lo hacía al aumentar la longitud del paso óptico.

La combinación de estas investigaciones dio lugar a la *ley fundamental de la absorción*, conocida hoy como *Ley de Lambert-Beer*, que se expresa como:

A = *a b c*

donde

A es la absorbancia de la sustancia y es adimensional.

a es una constante de proporcionalidad llamada absortividad, que expresa la capacidad o poder de absorción de una sustancia y se expresa en L/cm.g.

b es la trayectoria que recorre el haz incidente dentro de la sustancia, es decir la longitud del paso óptico y se expresa en centímetros

c es la concentración de la sustancia y se expresa en g/L

Cuando la concentración se expresa en mol/L el término a se denomina absortividad molar o coeficiente de absorción molar y se representa por el símbolo ε expresándose en unidades de L/cm.mol. La ley de Lambert-Beer quedaría entonces:

A = ε b c

que constituye la manera más usual de representarla.

Párrafo aparte merece el término ε por la importancia que reviste en los procesos de absorción molecular. El coeficiente de absorción molar ε, expresa como ya se mencionó el poder de absorción de una sustancia y depende, entre otros factores, de la naturaleza de la sustancia y de la longitud de onda. Ello significa que un mol de diferentes sustancias absorberá diferentes cantidades de energía dependiendo de su estructura y habrá para cada sustancia un valor diferente de ε, el cual se reporta a la longitud de onda de máxima absorción.

La tabla 3.1 muestra una relación de vitaminas con sus respectivos coeficientes de extinción mola a la longitud de onda de máxima absorción.

Tabla 3.1. Valores de ε_{max} y λ_{max} de algunas vitaminas

Vitaminas	**λ_{max} (nm)**	**ε_{max} (L/cm.mol)**
Retinol	325	1 832
Retinal	381	1 530
β-caroteno	273	383
	453	2 592
	481	2 268
Riboflavina	267	850
Cianocobalamina	278	115
	361	307

Nótese que el β-caroteno exhibe tres máximos de absorción con sus respectivos coeficientes de extinción molar. Está claro que la determinación de esta vitamina convendría realizarla a 453 nm por cuanto es a ese valor de λ que esta sustancia exhibe un mayor poder de absorción, por lo tanto a esta longitud de onda habrá mayor sensibilidad puesto que podrán detectarse menores concentraciones de esta sustancia.

3.3.1. Desviaciones de la Ley de Lambert-Beer

La ley de Lambert-Beer (***A= ε b c***) posee una enorme importancia para el análisis cuantitativo pues establece una relación lineal entre la absorbancia y la concentración de la sustancia que absorbe, sin embargo frecuentemente se producen desviaciones (figura 3.4) de la proporcionalidad directa entre la absorbancia y la concentración que es necesario considerar.

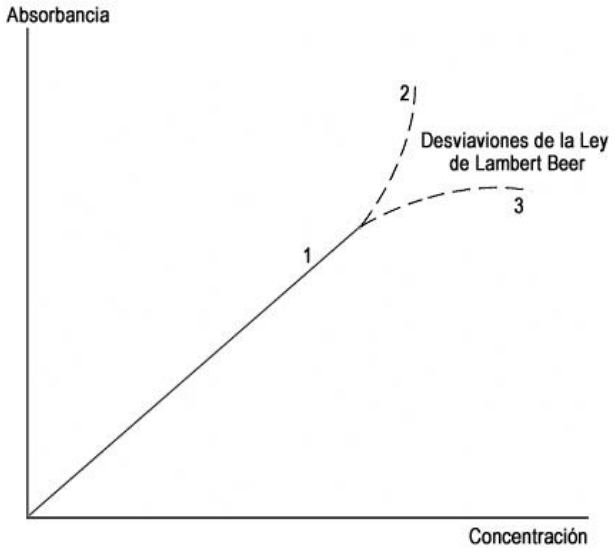


Figura 3.4. Cumplimiento y desviaciones de la ley de Lambert-Beer.
(1) cumplimiento de la ley, (2) desviación positiva, (3) desviación negativa

La ley de Lambert-Beer es solo válida para concentraciones ≤ a 0.01 M. En altas concentraciones, la distancia entre las especies que causan absorción disminuye

hasta el punto en que cada una afecta la distribución de carga de sus vecinas lo que puede afectar su capacidad de absorber radiación a una λ dada. Puesto que el grado de interacción depende de la concentración, esto causa desviaciones en la relación lineal entre absorbancia y concentración.

Un segundo requisito para el cumplimiento de esta ley, y que de no verificarse representa la desviación instrumental más importante, es que la radiación utilizada tiene que ser monocromática. Esta observación constituye una manifestación del carácter límite de la ley de Lambert-Beer dado que rara vez se puede utilizar en forma práctica una radiación estrictamente de una sola longitud de onda, pues los dispositivos (monocromadores) que permiten aislar porciones de la radiación de salida de una fuente continua usualmente también dejan pasar una pequeña fracción de radiación contaminante de otras longitudes de onda. Para que una radiación se considere adecuada para el cumplimiento de la ley, la $\Delta\lambda$ de la radiación que sale del monocromador debe ser sensiblemente menor que la anchura de las bandas de absorción de la sustancia en estudio.

Existen también desviaciones químicas que se producen como consecuencia de asociación, disociación o reacción de la sustancia con el disolvente y provocan cambios en los equilibrios químicos con la consecuente aparición de especies absorbentes a distintas longitudes de onda.

Otras fuentes de errores instrumentales menos frecuentes son la fatiga de la fotocelda, las fluctuaciones de las fuentes de radiación y la inestabilidad del voltaje entre otros muchos factores agrupados dentro de los errores instrumentales.

3.4. ESPECIES ABSORBENTES

La absorción de radiación ultravioleta y visible por una especie M puede considerarse como un proceso de excitación indicado por la ecuación:

$$M + h\nu \rightarrow M^*$$

donde M* representa la partícula atómica o molecular en su estado electrónico excitado que se produce como resultado de la absorción del fotón $h\nu$. Este estado excitado tiene un tiempo de existencia muy breve (10^{-8} a 10^{-9} segundos) y desaparece a través de un proceso de relajación que usualmente involucra la conversión de la energía de excitación en calor, aunque también puede existir relajación para formar nuevas especies químicas (reacción fotoquímica) y en menor cuantía puede producirse la emisión de radiación fluorescente y fosforescente.

Ahora bien, resulta importante analizar cuáles son las transiciones electrónicas más importantes que se producen por absorción de radiación electromagnética de las zonas del UV y el visible, por cuanto ello permitirá inferir que sustancias, en función de su estructura, son capaces de absorber y por tanto ser analizadas por espectrometría UV-visible.

Las especies químicas absorbentes en la región del UV-Vis pueden clasificarse en dos grupos: especies absorbentes con electrones π, σ y n y especies absorbentes que manifiestan transiciones por transferencia de carga.

3.4.1. Especies químicas absorbentes que contienen electrones π, σ y n.

Las especies químicas de este grupo comprenden tanto moléculas orgánicas como inorgánicas.

Todos los compuestos orgánicos pueden absorber radiación electromagnética porque todos contienen electrones de valencia que pueden ser excitados a niveles de energía más altos, sin embargo, no todos los compuestos orgánicos pueden ser analizados por espectrometría UV-visible por cuanto la absorción en la zona del UV lejano o de vacío, presenta los inconvenientes mencionados con anterioridad lo que limita considerablemente su aplicación práctica.

Los electrones que contribuyen a las características de absorción de una molécula orgánica son: 1) los electrones que participan directamente en la formación de enlaces entre átomos (electrones σ y π) y se asocian con más de un átomo y 2) los electrones exteriores no enlazados o no compartidos (electrones n) situados principalmente en átomos como oxígeno, halógenos, azufre y nitrógeno.

Recordemos algunos elementos básicos de química general que ayudaran a entender el proceso de absorción de estas especies.

En una molécula orgánica, los campos no localizados entre átomos ocupados por electrones de enlace se llaman orbitales moleculares y pueden considerarse como resultado de la superposición de orbitales atómicos. Cuando se combinan dos orbitales atómicos, resulta un *orbital molecular de enlace de baja energía* o un *orbital molecular antienlace de alta energía*. En el estado base o fundamental de una molécula, los electrones ocupan el primero.

Los orbitales moleculares asociados con los simples enlaces de las moléculas orgánicas se denominan *orbitales sigmas* (σ) y los electrones correspondientes son *electrones* σ. El doble enlace en las moléculas orgánicas contiene dos tipos de orbitales moleculares: un orbital sigma (σ) correspondiente a uno de los pares de electrones del enlace, y un *orbital molecular pi* (π) asociado con el otro. Además de los electrones σ y π muchas moléculas orgánicas contienen electrones que no forman enlaces. Estos *electrones no compartidos* se conocen como electrones n. en la figura 3.5 Se muestra un ejemplo en el que pueden verse los tres tipos de electrones en una molécula orgánica simple.

Por absorción de radiación electromagnética de las zonas UV-vis, se producen transiciones de los electrones desde un orbital de enlace a un orbital antienlace excitado. Las transiciones energéticas asociadas a estos orbitales y responsables de la absorción, pueden ser de cuatro tipos fundamentales: $\sigma \rightarrow \sigma^*$, n $\rightarrow \sigma^*$, n $\rightarrow \pi^*$ y $\pi \rightarrow \pi^*$.

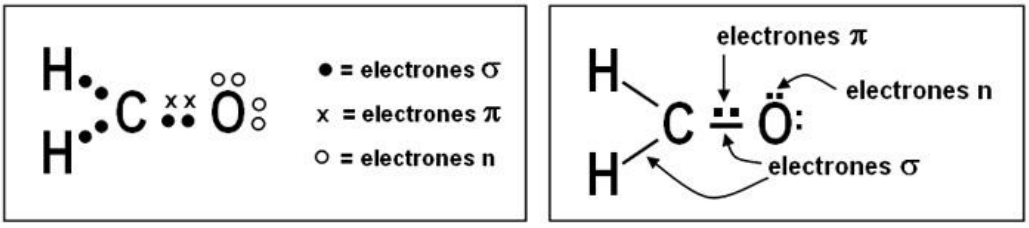


Figura3.5. Dos maneras de representar los diferentes tipos de electrones en la molécula de formaldehido

Las energías necesarias para producir estas transiciones electrónicas de los distintos tipos de orbitales moleculares difieren considerablemente. En la figura 3.6 se observa que las transiciones electrónicas de los orbitales σ requieren mayor energía que la de lo orbitales π y que los electrones n son los de menor requerimiento energético para la excitación.

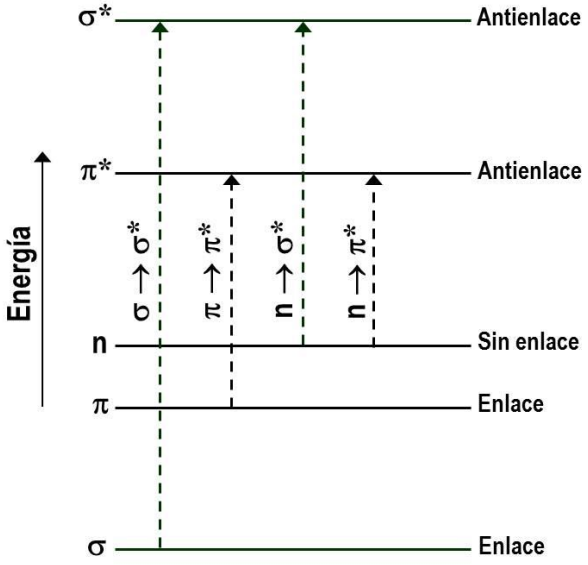


Figura 3.6. Niveles electrónicos de energía molecular.

Transiciones $\sigma \rightarrow \sigma^*$. En este caso un electrón de un orbital de enlace σ de una molécula es excitado por absorción de radiación al correspondiente orbital antienlace σ*. Se describe entonces que la molécula ha experimentado una transición $\sigma \rightarrow \sigma^*$. Con relación a las otras transiciones posibles. La energía requerida para inducir una transición $\sigma \rightarrow \sigma^*$ es muy grande y corresponde a las frecuencias de la zona del ultravioleta lejano o del vacío, por lo que desde el punto de vista de sus aplicaciones analíticas no presenta utilidad.

Transiciones $n \rightarrow \sigma^*$. Los compuestos saturados que contienen átomos con pares de electrones no compartidos (electrones sin enlace) pueden presentar este tipo de transición. Generalmente estas transiciones requieren menos energía que las del tipo $\sigma \rightarrow \sigma^*$ y pueden provocarse por radiaciones de la zona entre 150 y 250 nm y el mayor número de picos de absorción aparecen por debajo de los 200 nm. Las absortividades molares (ε) asociadas con este tipo de transición son intermedias en magnitud y varían de 100 a 3000 L/cm.mol. El número de grupos funcionales orgánicos con transiciones $n \rightarrow \sigma^*$ en la región

ultravioleta fácilmente accesible es relativamente pequeño, por lo que puede afirmarse que esta transición es de las menos importantes en cuanto a su ocurrencia por absorción de radiación.

Transiciones n $\rightarrow$ π^* y $\pi \rightarrow \pi^*$. La mayoría de las aplicaciones de la espectrometría de absorción UV-vis en compuestos orgánicos se basan en transiciones de electrones n o electrones π al estado excitado π^*, porque las energías requeridas para estos procesos producen bandas de absorción en una zona espectral experimentalmente conveniente (200 a 700 nm). De ahí que puede plantearse que constituyen las transiciones más importantes en la espectrometría UV-vis.

Las absortividades molares para los picos relacionados con la excitación n $\rightarrow \pi^*$ son por lo general bajas y suelen caer dentro del intervalo de 10 a 100 L/cm.mol; en cambio los valores para las transiciones $\pi \rightarrow \pi^*$, caen normalmente dentro del intervalo de 1000 a 10 000. Otra diferencia característica entre los dos picos de absorción se halla en el efecto del disolvente sobre la longitud de onda. Los picos que proceden de transiciones n $\rightarrow \pi^*$ son desplazados generalmente a longitudes de onda más cortas al aumentar la polaridad del disolvente, lo que se conoce como efecto hipsocrómico. Este proceso es resultado de la mayor solvatación del par de electrones no enlazados, que reduce la energía del orbital n, provocando que se requiera una mayor energía para alcanzar el estado excitado π^*. Generalmente, pero no siempre, se observa una tendencia inversa (efecto batocrómico) para transiciones $\pi \rightarrow \pi^*$.

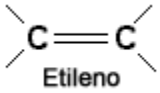
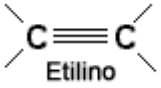
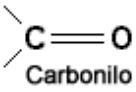
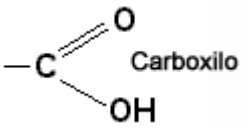
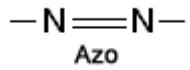
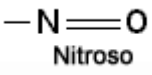
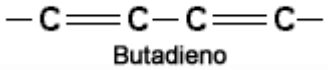
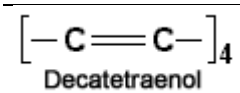
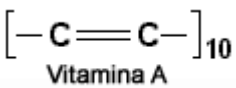
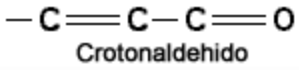
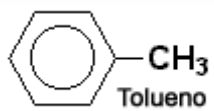
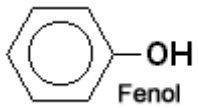
De cualquier modo, para que se produzca cualquiera de estas dos transiciones se requiere la presencia en la molécula de al menos un grupo funcional insaturado que proporcione los orbitales π. A estos grupos funcionales insaturados capaces de experimentar transiciones n $\rightarrow \pi^*$ y $\pi \rightarrow \pi^*$ (y principales responsables de la absorción de radiación UV-vis) se les denomina grupos cromóforos.

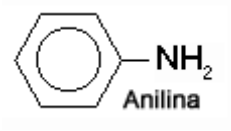
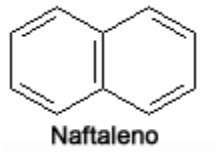
En la tabla 3.2 Se muestran algunos cromóforos orgánicos comunes y la localización aproximada de sus máximos de absorción. Los datos de localización (λ_{max}) e intensidad (ε) de los picos pueden servir solamente como guía aproximada para la identificación de grupos funcionales, porque la posición de los máximos es afectada tanto por el disolvente como por los detalles estructurales. Por otra parte, los picos suelen ser anchos debido a los efectos vibratorios, lo que dificulta aún más la determinación precisa de la posición de los máximos.

Del análisis de esta tabla se desprende también el marcado efecto que tiene la conjugación sobre las bandas de absorción. Nótese que en la medida en que aumenta la conjugación las bandas de absorción se desplazan hacia longitudes de ondas mayores, es decir que se requiere menor energía para provocar la transición $\pi \rightarrow \pi^*$. Ello se debe a que el fenómeno de conjugación conduce a un desplazamiento de los electrones π cuyos orbitales comprenden ahora cuatro centros atómicos o más (nube π), produciendo una reducción de los niveles de energía del orbital π^*, dándole menos carácter de antienlace y disminuyendo la

cantidad de energía necesaria para causar la excitación. Obsérvese además los elevados valores de absortividad molar característicos en estos compuestos lo que favorece su análisis por espectrometría UV-vis.

Tabla 3.2. Características de absorción de algunos cromóforos

Cromóforo	Disolvente	λ_{max}	ε	Transición
 Etileno	n Heptano	180	13 000	$\pi - \pi^*$
 Etilino	n Hexano	178 196 225	10 000 2 000 160	$\pi - \pi^*$
 Carbonilo	n Heptano	186 280	1 000 16	$n - \sigma^*$ $n - \pi^*$
 Carboxilo	Etanol	204	41	$n - \pi^*$
 Azo	Etanol	300 – 400	≈ 8 000	$n - \pi^*$
 Nitroso	Éter etílico	≈ 300	100	$n - \pi^*$
Sistemas conjugados				
 Butadieno	Hexano	220	20 900	$\pi - \pi^*$
 Decatetraenol	Etanol	300	64 000	$\pi - \pi^*$
 Vitamina A	Etanol	328	51 000	$\pi - \pi^*$
 Crotonaldehido	Etanol	217 321	16 000 20	$\pi - \pi^*$
Benceno	Etanol	204 256	7 900 200	$\pi - \pi^*$
 Tolueno	-	207 261	7 000 300	$\pi - \pi^*$
 Fenol	-	211 270	6 200 1 450	$\pi - \pi^*$

Cromóforo	Disolvente	λ_{max}	ε	Transición
 Anilina	-	230 280	8 600 1 430	
 Naftaleno	Etanol	220 275 214	11 000 5 600 320	$\pi - \pi^*$

Párrafo aparte debe dedicarse al caso de los hidrocarburos aromáticos, cuyos espectros UV se caracterizan por varias bandas de absorción originadas por transiciones $\pi \rightarrow \pi^*$. En la tabla 3.2 se observa que las bandas características del benceno son afectadas por los sustituyentes del anillo. Nótese que la incorporación del grupo OH (en el caso del fenol) y el grupo NH_2 (en la anilina) producen un desplazamiento de los máximos de absorción con respecto al benceno hacia longitudes de ondas más largas de menor energía (efecto batocrómico) con un incremento de su intensidad, particularmente de la segunda banda. Esto sucede por la presencia en estos sustituyentes de al menos un par de electrones n, capaces de interaccionar con los electrones π del anillo estabilizando el estado π^* con la consecuente reducción de su energía. Estos grupos funcionales que no absorben radiación UV-vis por si mismos, pero que unidos a un cromóforo tienen la capacidad de desplazar sus máximos de absorción hacia longitud de ondas mayores se denominan *grupos auxocromos*.

La figura 3.7 muestra el efecto explicado para el caso de los espectros de absorción de la tirosina y la fenilalanina

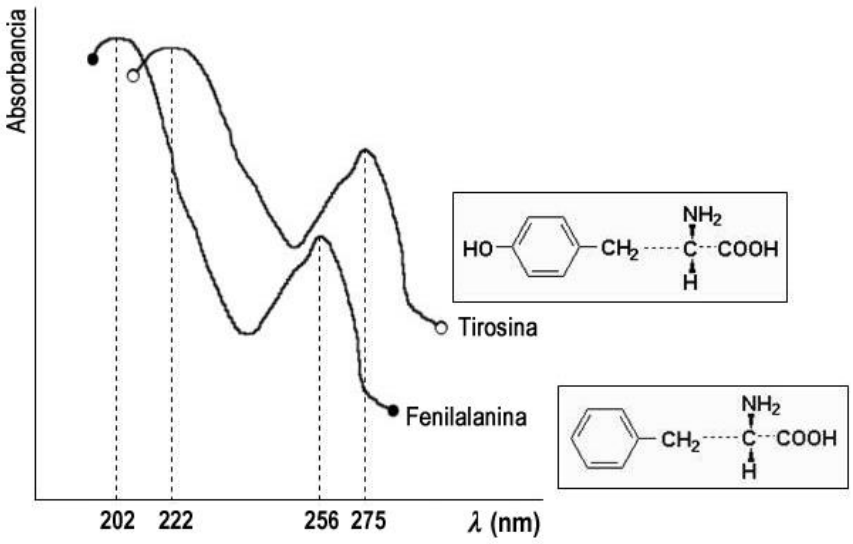


Figura 3.7. Desplazamiento de las longitudes de onda máximas por efecto de la sustitución de un grupo OH. *Nótese que las estructuras de la Tirosina y la Fenilalanina son casi idénticas. El grupo OH de la Tirosina provoca un efecto batocrómico del espectro hacia valores mayores de longitudes de onda con respecto a la Fenilalanina.*

Finalmente debe señalarse que dentro de las especies absorbentes se encuentran también aniones inorgánicos que presentan picos de absorción en el ultravioleta como consecuencia de transiciones $n \rightarrow \pi^*$. Como ejemplo pueden mencionarse el nitrato (313 nm), el nitrito (360 y 280 nm), el carbonato (217 nm) y el tritiocarbonato (500 nm) (figura 3.8)

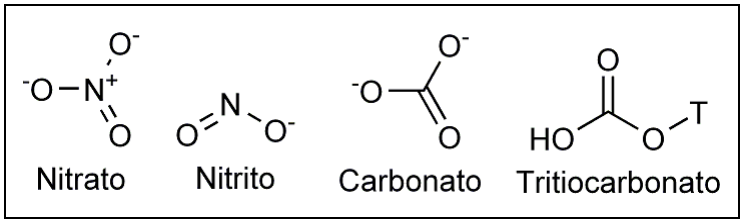


Figura 3.8. Especies absorbentes inorgánicas con transiciones n → π*

3.4.2. Absorción por transferencia de carga

Para fines analíticos el tipo más importante de absorción por especies inorgánicas es la absorción por transferencia de carga, porque las absortividades molares se los picos son muy grandes (ε_{max} > 10 000). En consecuencia, estos complejos constituyen un medio muy sensible para detectar y cuantificar las especies absorbentes correspondientes. Muchos complejos inorgánicos exhiben este tipo de absorción y por consiguiente se denominan complejos de transferencia de carga.

Ejemplos comunes son el tiocianato y los complejos fenólicos de hierro (III), el complejo ortofenantrolina de hierro (II), el complejo del yodo molecular con el yoduro y el complejo ferro-ferricianuro.

Para que un complejo exhiba un espectro por transferencia de carga es necesario que uno de sus componentes tenga características de donador de electrones y el otro, propiedades de aceptor de electrones. La absorción de radiación supone entonces la transición de un electrón del donador a un orbital asociado en gran parte con el aceptor. Como consecuencia, el estado excitado es el producto de un proceso interno de oxidación-reducción.

Un ejemplo muy conocido de absorción por transferencia de carga se observa en el complejo hierro (III)-ion tiocianato. La absorción de radiación provoca la transición de un electrón del tiocianato a un orbital asociado en gran parte con el hierro (III). El producto es así una especie excitada que comprende predominantemente hierro (II) y el radical tiocianato SCN.

Al aumentar la tendencia a la transferencia de electrones, se requiere menos energía radiante para el proceso de transferencia de carga y los complejos resultantes absorben a longitudes de ondas más largas. Por ejemplo, el ion tiocianato es mejor donador de electrones (agente reductor) que el ion cloruro; así, la absorción del complejo de tiocianato con hierro (III) se realiza en la región del visible mientras que el máximo de absorción del complejo cloruro-hierro (III)

se presenta en la región ultravioleta.

En la mayoría de los complejos de transferencia de carga en que interviene el ión metálico, el metal actúa como aceptor de electrones, sin embargo existen excepciones como en el caso del complejo de la ortofenantrolina con hierro (II) o con cobre (I) en los que el ligando es el aceptor y el metal es el donador.

3.5. INSTRUMENTOS DE MEDICIÓN

Los instrumentos empleados en espectrometría de absorción molecular UV-visible miden las señales analíticas de absorbancia y transmitancia y se pueden clasificar en dos tipos principales:

- Colorímetro o fotocolorímetro. Realizan las mediciones en la zona del visible (400-800 nm). Se utilizan en el análisis de sustancias coloreadas.
- Espectrofotómetro: Realiza mediciones en diferentes regiones del espectro en función del rango de longitudes de onda para las cuales han sido diseñados. La gran ventaja de los espectrofotómetros es que permiten obtener los espectros de absorción, sometiendo a la sustancia en estudio a un barrido selectivo de diferentes longitudes de onda. En la actualidad es usual encontrar espectrofotómetros UV-visible capaces de realizar mediciones de absorbancia y transmitancia en rangos de 190 a 1000 nm.

Con independencia de su diseño de las particularidades de su diseño constructivo, estos equipos contienen cinco componentes básicos:

1. Fuente de radiación, encargada de proporcionar la radiación incidente policromática de potencia P_0.
2. Selector de longitud de onda, cuya función es convertir la radiación policromática emitida por la fuente en radiación monocromática de una sola longitud de onda.
3. Cubetas, que constituyen recipientes transparentes que contienen la muestra en disolución, la cual llega radiación monocromática de potencia P_0. Una parte de esta radiación es absorbida por la muestra (en función de su concentración) y otra es transmitida (P_t).
4. Detector, el convierte la radiación transmitida P_t, en una señal eléctrica medible.
5. Registrador y procesador de datos, cuya función es registrar la señal en forma de absorbancia o transmitancia. En la actualidad el registrador es un sistema de cómputo capaz de procesar estas señales para obtener espectros y realizar análisis cuantitativo.

La figura 3.9, muestra de forma esquemática la disposición de estos componentes y los procesos que tienen lugar.

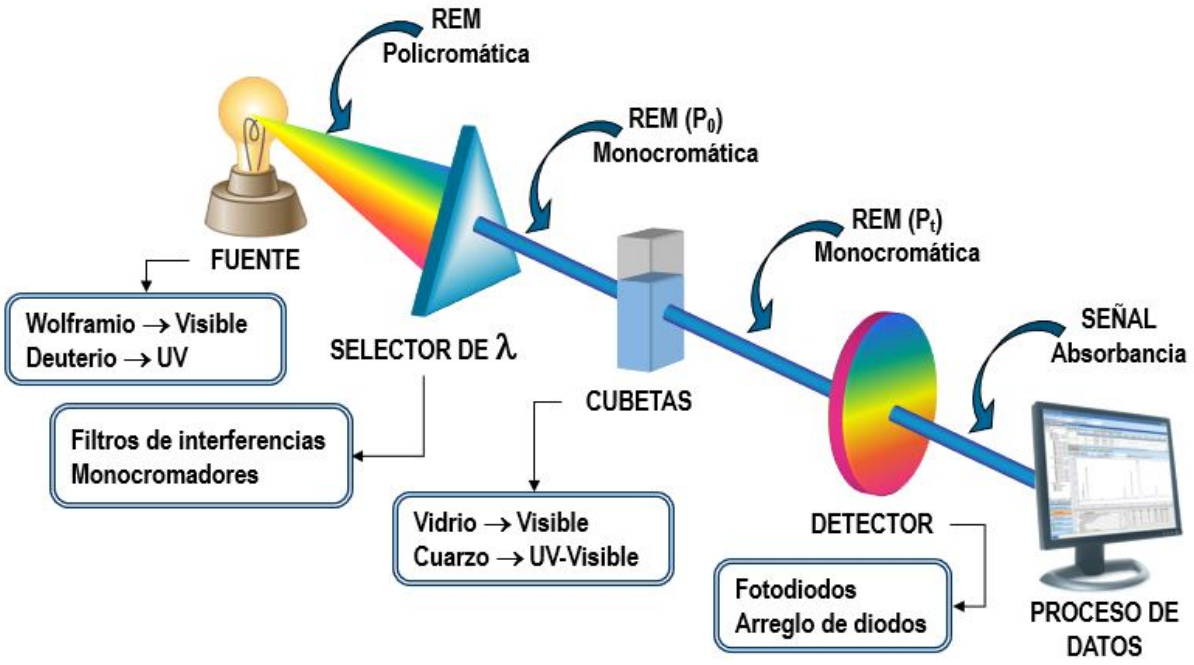


Figura 3.9. Componentes básicos de los instrumentos para medir absorción de radiación.

Las características de cada uno de estos componentes se expondrán brevemente a continuación.

3.5.1. Fuentes de radiación

Una fuente adecuada para estudios espectroscópicos debe cumplir los siguientes requisitos:

1. Producir un haz de radiación cuya potencia P_0 sea suficiente para facilitar la detección y medición de la señal analítica.
2. La radiación emitida debe ser continua, es decir policromática, contentiva de todas las longitudes de onda correspondientes a la región del espectro en que va a realizarse la medición.
3. La potencia P_0 de la radiación emitida debe ser estable.

En espectrometría de absorción molecular UV-visible se emplean dos tipos de fuentes principales en función de la región del espectro en que se requiera trabajar.

Lámparas de Hidrógeno o Deuterio. Producen un espectro continuo en la región del UV (160 – 375 nm) por excitación del hidrógeno o el deuterio a baja presión con una descarga eléctrica. En la actualidad se emplean con mayor frecuencia las lámparas de Deuterio pues cubren el mismo intervalo de longitudes de onda que las lámparas de hidrógeno y tienen la ventaja de aportar el triple de potencia. Otro elemento importante relacionado con las fuentes de radiación UV es que el material de construcción debe ser el cuarzo pues el vidrio muestra una fuerte absorción en esta zona del espectro.

Lámpara de Wolframio. Conocida comúnmente como *lámpara de filamento de tungsteno*, constituye la fuente más común de radiación visible e infrarrojo cercano. Es útil en un rango de longitudes de onda entre 320 y 2500 nm.

Los espectrofotómetros UV-visibles actuales poseen las dos lámparas (Deuterio y Wolframio) que cambian automáticamente en función de la longitud de onda seleccionada. Estos instrumentos cubren un rango útil de trabajo entre 190 y 1100 nm.

3.5.2. Selector de longitud de onda

Tienen la función de aislar una radiación de una sola longitud de onda, la cual llegará al recipiente con la muestra. La radiación que llega a la muestra debe ser monocromática debido a que:

- Aumenta la probabilidad de que el sistema absorbente cumpla con la ley de Lambert-Beer.
- Se garantiza una mayor selectividad ya que otras sustancias presentes en la muestra que absorban a otras longitudes de onda no deben interferir.
- Aumenta la sensibilidad del método debido a que las lecturas se realizan a la λ_{max}, en la que la especie muestra su mayor capacidad de absorción.

Debe señalarse que hasta hoy no existe ningún dispositivo capaz de aislar una radiación de una única longitud de onda, sino que además de la banda seleccionada dejan pasar una cierta cantidad de radiación contaminante de otras longitudes de onda. Al intervalo de longitudes de onda que pasa a través de un selector de λ se le llama *ancho de banda*. Obviamente en la medida que el ancho de banda sea menor, será menor también la radiación contaminante y consecuentemente el selector será más eficiente.

Son numerosos los dispositivos que se emplean con el fin de producir bandas limitadas de radiación. Los más importantes son los filtros y los monocromadores.

A. Filtros

Son los más sencillos y menos costosos. Pueden ser de dos tipos: de absorción y de interferencia.

Filtros de absorción. Consisten generalmente en placas de vidrio coloreado que absorben ciertas porciones de los espectros limitando su paso a través de ellos. Pueden utilizarse exclusivamente en la región del visible y poseen anchos de banda efectivos entre $\pm$ 30 y $\pm$ 50 nm.

Filtros de interferencia. Se basan en la interferencia óptica para producir bandas relativamente estrechas de radiación. Consiste en un dieléctrico transparente (frecuentemente fluoruro de calcio o fluoruro de magnesio) que ocupa el espacio comprendido entre dos películas metálicas semitransparentes revestidas en sus superficies interiores con dos placas de vidrio. El espesor de la capa dieléctrica se controla cuidadosamente y determina la longitud de onda de la radiación

transmitida. Los filtros de interferencia proporcionan anchos de banda considerablemente menores que los filtros de absorción (alrededor de ± 10 nm) y pueden usarse tanto en el visible como en el UV.

B. Monocromadores.

Un monocromador es un dispositivo que descompone la radiación policromática en sus longitudes de onda componentes y permite separar una banda del espectro, generalmente más estrecha que la que proporciona un filtro. En general un monocromador está integrado por un sistema de ranuras y lentes y un elemento dispersante que puede ser un prisma o una rejilla de difracción.

El funcionamiento general de estos dispositivos se ilustra en la figura 3.10.

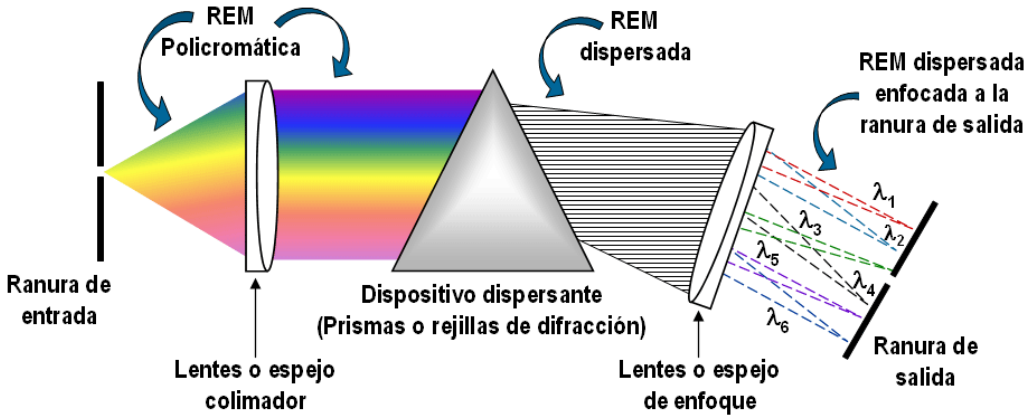


Figura 3.10. Esquema general de un monocromador. *La radiación penetra por una ranura de entrada, es colimada por un lente que produce haces de radiación paralela, los cuales llegan al dispositivo dispersante y son dispersados por refracción (prismas) o difracción (rejillas). Los haces de radiación monocromática son enfocados luego enfocados hacia la ranura de salida. Haciendo girar el dispositivo dispersante, se logra que la radiación de la longitud de onda deseada atraviese la ranura de salida.*

Las ranuras de un monocromador desempeñan un papel importante en la calidad de estos, pues cuanto más estrecha sea la ranura de salida de la radiación (luego de que la mayoría de la radiación incidente policromática ha sido dispersada por el prisma o la rejilla) y mayor la distancia del prisma o la rejilla, menor será el ancho de banda y por tanto de mayor calidad será el monocromador.

Los monocromadores actuales contienen por lo general dos elementos dispersantes, es decir dos prismas, dos rejillas o un prisma y una rejilla y poseen una gran resolución espectral con anchos de banda de ± 1 nm.

3.5.3. Recipientes para la muestra

Las *celdas* o *cubetas* para la muestra deben estar construidas de un material que permita el paso de la radiación de la región espectral que interesa. Para el trabajo en las regiones del UV-visible se emplean dos tipos de cubetas fundamentales:

- *Cubetas de vidrio*, las cuales se emplean únicamente para realizar mediciones en la región del visible. No es posible emplearlas para trabajos en el

ultravioleta debido a que el vidrio absorbe radiación UV por debajo de 350 nm.

- *Cubetas de cuarzo*, empleadas tanto para lecturas en el UV como en el visible por cuanto este material no absorbe radiación en ninguna de las dos regiones.

Las mejores celdas poseen ventanas perfectamente perpendiculares al haz de radiación para reducir al mínimo las pérdidas por reflexión. La longitud del paso óptico (ancho de la cubeta) más común para el trabajo en las regiones UV-vis, es 1 cm, aunque comercialmente se pueden obtener de otras dimensiones.

La calidad de los datos de absorbancia depende en gran medida de la forma en que se manipulan y mantienen las cubetas. Las huellas dactilares, la grasa y otros depósitos sobre la pared de la cubeta alteran notablemente sus características de transmisión, por lo que resulta imperativa la limpieza antes y después de su uso.

3.5.4. Detectores

El principio general de funcionamiento de un detector UV-vis consiste en su capacidad para convertir la energía radiante en corriente eléctrica. Los requisitos que debe cumplir un detector UV-vis son los siguientes:

- Respuesta rápida a la energía radiante de un amplio intervalo de longitudes de onda.
- Sensibilidad a bajos niveles de potencia radiante.
- Producir una señal eléctrica que pueda ser fácilmente amplificada y medida.
- Tener un nivel de ruido relativamente bajo.
- La señal producida debe ser directamente proporcional a la potencia del haz de radiación incidente.

Todos los detectores empleados en espectrometría UV-vis se fundamentan en el efecto fotoeléctrico, consistente en la interacción de la radiación electromagnética con una superficie reactiva que produce electrones (fotoemisión) o promueve electrones a estados energéticos en los que pueden conducir la electricidad (fotoconducción).

Los detectores fotoeléctricos pueden ser de varios tipos:

- *Celdas fotovoltaicas*, en las cuales la energía radiante genera una corriente en la interfase entre una capa semiconductora y un metal.
- *Fototubos*, en los que la radiación produce emisión de electrones a partir de una superficie sólida fotosensible.
- *Tubos fotomultiplicadores*, que contienen una superficie fotoemisora así como varias superficies adicionales que emiten electrones en cascada cuando son alcanzadas por los electrones de la región fotosensible.

En general los espectrofotómetros actuales poseen un sistema de barrido

conocido como arreglo de diodos, que acopla el movimiento del elemento dispersivo (prisma o rejillas) en el monocromador, y por lo tanto la longitud de onda de la radiación analizada, con la salida del detector, que corresponde a la absorción selectiva de la muestra a dicha radiación. El registro del espectro se realiza de forma automática.

3.5.5. Registro y procesamiento de datos

El procesador de señal es por lo general un dispositivo electrónico que amplifica la señal eléctrica generada por el detector y registra el valor de absorbancia y/o transmitancia. Puede además modificar la señal transformándola de continua a alterna y viceversa, así como también cambiar su fase. En la actualidad el registro de la señal de absorbancia y la transmitancia se acopla a sistemas computarizados que con ayuda de potentes softwares almacenan la información, realizan cálculos cuantitativos y poseen enormes bases de datos de espectros (también llamadas espectrotecas) de diferentes sustancias, que permiten realizar comparaciones casi instantáneas con fines cualitativos.

La figura 3.11 muestra un modelo actual con algunas de sus especificaciones.

Rango de λ	190 – 1100 nm
Anchura de ranura	1 nm
Precisión de λ	<± 0.5 nm
Reproducibilidad de λ	<± 0.02 nm
Precisión fotométrica	<± 0.01 A
Ruido	< 0.0002 A
Estabilidad fotométrica	< 0.001 A/h
Detector	Arreglo de diodos
Tiempo de barrido	1.2 segundos

Figura 3.11. Espectrofotómetro UV-visible de la firma Agilent Technologies, 2006.

3.6. APLICACIONES CUALITATIVAS DE LA ESPECTROMETRÍA DE ABSORCIÓN UV-VISIBLE

La identificación de un compuesto puro por espectrometría de absorción molecular UV-visible se realiza teniendo en cuenta las características del espectro de absorción (máximos, mínimos y puntos de inflexión). La manera más fiel de realizar este procedimiento es mediante la comparación del espectro de absorción de la muestra desconocida con el espectro obtenido para un patrón de referencia conocido. Una estrecha semejanza entre ambos espectros constituye un acercamiento importante a la identidad de la muestra.

La comparación del espectro de la muestra puede realizarse contra espectros

reportados en la literatura o almacenados en bases de datos computarizadas, pero este procedimiento presenta el inconveniente de no reproducir exactamente las condiciones experimentales (disolvente, pH, temperatura, etc) en que se obtienen ambos espectros. Lo más aconsejable es por lo tanto obtener experimentalmente bajo idénticas condiciones los espectros de la muestra y el patrón de referencia a fin de hacer más exacta la comparación.

Ahora bien, la utilización de la espectrometría UV-visible en el análisis cualitativo es limitada porque los espectros están formados por bandas anchas que carecen de detalle y la información que brindan está relacionada solo con la presencia de ciertos grupos funcionales (cromóforos) capaces de absorber, pero no con el resto de la estructura. Los máximos de absorción electrónica de muchos cromóforos no se afectan apreciablemente por las características estructurales de los grupos no absorbentes que conforman la estructura molecular; como consecuencia, dos sustancias de estructura diferente con iguales cromóforos brindarán espectros de absorción muy semejantes.

No obstante, los espectros de absorción UV-visible son útiles para descubrir la presencia de ciertos grupos funcionales que actúan como cromóforos. Por ejemplo, una débil banda de absorción en la región de los 280 a 290 nm que se desplaza a longitudes de onda más cortas con el aumento de la polaridad del solvente, es una fuerte indicación de la presencia del grupo carbonilo; así mismo, una débil banda en 260 nm con indicaciones de estructura fina vibratoria constituye una prueba de la presencia de un anillo aromático.

La existencia de técnicas analíticas de mayor poder de identificación como la espectroscopia infrarroja (IR), la espectrometría de masas (EM) y la espectroscopia de resonancia magnético nuclear (RMN), unido a las limitaciones de la espectrometría UV-visible ya señaladas, han conducido a que la aplicación de esta última en el análisis cualitativo se realice casi únicamente con fines corroborativos, es decir cuando se posee una fuerte sospecha de la presencia de una determinada sustancia en una matriz dada.

Finalmente debe señalarse que para la obtención de los espectros de absorción debe realizarse una cuidadosa preparación de la muestra que garantice el aislamiento del compuesto a analizar, sin la presencia de otras especies absorbentes que obviamente conducirían a alteraciones del espectro obtenido.

3.7. APLICACIONES CUANTITATIVAS DE LA ESPECTROMETRÍA UV-VISIBLE

La espectrometría de absorción molécula UV-visible, constituye una poderosa herramienta para e análisis cuantitativo. Las características más importantes de estos métodos pueden resumirse en las siguientes:

- *Gran aplicación*. Una gran variedad de especies orgánicas e inorgánicas absorben en las longitudes de onda de las regiones ultravioleta y visible, y por ello son susceptibles a su cuantificación. Por otra parte, muchas especies no absorbentes pueden ser analizadas después de ser sometidas a

transformaciones químicas para convertirlas en especies absorbentes.

- *Alta sensibilidad*. Las absortividades molares (ε) de 10 000 a 40 000 son comunes, particularmente para los complejos de transferencia de carga de las especies inorgánicas. En consecuencia, es posible el análisis de concentraciones en el intervalo de 10^{-4} 10^{-5} mol/L.
- *Adecuada selectividad*. Es posible encontrar regiones de longitud de onda en las que el único componente absorbente de una muestra sea la sustancia que se determina.
- *Alta precisión*. Los espectrofotómetros actuales poseen una elevada precisión y reproducibilidad. El error relativo de las mediciones de concentración se encuentra entre 1 y 2 %.
- *Facilidad y comodidad*. Las mediciones espectrofotométricas se realizan con rapidez empleando equipamientos instrumentales de fácil empleo y manipulación.

3.7.1. Establecimiento de las condiciones de trabajo.

Los primeros pasos en una determinación espectrofotométrica están relacionados con el establecimiento de ciertas condiciones de trabajo que garanticen el éxito de la cuantificación.

3.7.1.1. Elección de la longitud de onda de trabajo

En el análisis cuantitativo la medición de la absorbancia se realiza generalmente a la longitud de onda de máxima absorción (λ_{max}) o a un valor muy cercano a esta, por cuanto a este valor hay una mayor sensibilidad debido a que el cambio de la absorbancia por unidad de concentración es también mayor.

Por otra parte, en el valor de λ_{max} hay una menor variabilidad de los valores de absorbancia cuando se producen variaciones en la longitud de onda, por lo que se incrementa la precisión del método (figura 3.12).

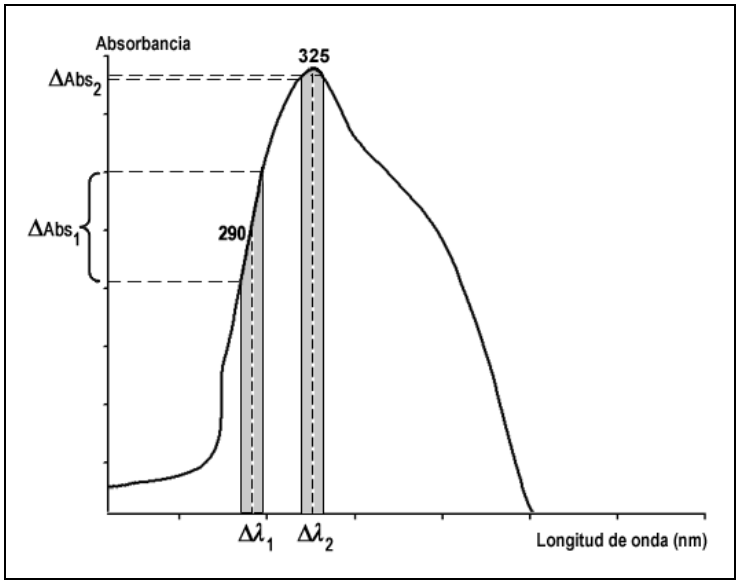


Figura 3.12. Influencia de la variación de la longitud de onda sobre la medición de absorbancia. *Nótese que idéntica variación en la longitud de onda ($\Delta\lambda_1=\Delta\lambda_2$), sombreadas en gris, produce una variación apreciablemente mayor en la lectura de absorbancia (ΔAbs_1) cuando la medición se realiza a una 290 nm, alejada del máximo de absorción (325 nm) en el cual la variación de absorbancia es despreciable (ΔAbs_2).*

3.7.1.2. Reacciones de derivatización a considerar

En espectrometría de absorción molecular UV-visible, es común someter la sustancia que se desea cuantificar a reacciones químicas con el objetivo de transformarla en un derivado (generalmente un complejo coloreado) con mejores propiedades de absorción. La reacción general que tiene lugar es:

Compuesto nativo + Reactivo derivatizador → Derivado (complejo coloreado)

Las razones para acometer este proceso pueden resumirse en los siguientes aspectos:

- El compuesto en su estado nativo no absorbe en las zonas del UV-visible. Por ejemplo, los azúcares no poseen grupos cromóforos y pueden hacerse reaccionar con el reactivo de antrona-ácido sulfúrico produciendo un complejo rojizo que cuya absorbancia se mide a 630 nm.
- El compuesto de interés absorbe en la zona del UV, pero el derivado coloreado posee una absortividad molar varios órdenes mayores a la del compuesto en su estado nativo, por lo que la derivatización aumenta significativamente la sensibilidad del método. Un clásico ejemplo lo constituye la determinación de proteínas. Todas las proteínas presentan un máximo de absorción en el UV alrededor de los 280 nm, por lo que pudieran ser cuantificadas en esta zona del espectro, sin embargo, se prefiere hacerlas reaccionar con el reactivo de Lowry y formar un derivado coloreado que se mide en el visible con una absortividad molar superior.
- En la mayoría de las muestras los compuestos a determinar están formando parte de una matriz compleja, conjuntamente con otras especies absorbentes que pudieran interferir en el análisis. En este caso la conversión de la sustancia de interés en un derivado coloreado con diferente estructura química, que se determina en otra región del espectro, permite su diferenciación del resto de los componentes de la matriz que absorben a longitudes de onda similares a las del compuesto de interés, en su estado nativo.

  Por ejemplo, el principio de la determinación de ácido láctico en vinos consiste en oxidar el ácido a acetaldehído y hacer reaccionar este último con piridina para formar un complejo violeta que se lee a 570 nm. De haber realizado esta determinación en el UV, otros ácidos presentes en el vino (cítrico, sórbico, málico) hubieran interferido en la determinación por cuanto todos tienen el mismo grupo cromóforo y absorben en un rango de longitudes de onda similar. De ahí que hubiera sido necesario realizar cuidadosos procedimientos previos para aislar el ácido láctico del resto de los compuestos interferentes. Sin embargo, la reacción con piridina para formar el complejo violeta es específica para el acetaldehído proveniente del ácido láctico y al realizar la medición en el visible (570 nm) los ácidos cítrico, sórbico y málico ya no constituyen interferencias.

Nótese que, en este caso, la derivatización logra aumentar la selectividad del método y evita la realización de engorrosos tratamientos de preparación de la muestra para aislar el componente de interés.

En el análisis de los alimentos son numerosos los procedimientos que emplean reacciones de derivatización para la formación de complejos coloreados que se miden en el visible. Estos métodos se agrupan bajo el nombre de *colorimetría* y los reactivos derivatizadores se denominan *reactivos cromogénicos* o *reactivos desarrolladores de color*.

3.7.1.3. Variables que influyen en la absorbancia

Algunas variables comunes que influyen en el espectro de absorción de una sustancia, y que por tanto influyen también en la absorbancia, son la naturaleza del disolvente, el pH de la solución, la temperatura, la concentración elevada de electrolitos y la presencia de sustancias interferentes. Es necesario conocer los efectos de estas variables y escoger un conjunto de condiciones analíticas adecuadas, de tal modo que la absorbancia no sea influida perceptiblemente por pequeñas variables de magnitud incontroladas.

3.7.1.4. El ensayo en blanco

En todos los métodos ópticos resulta obligatorio calibrar los equipos con una solución de un blanco, es decir una solución que no contiene la muestra, pero si los disolventes y el resto de los reactivos utilizados en la medición de la señal analítica (absorbancia en este caso) en la muestra.

Así por ejemplo si la muestra fue sometida a una reacción de derivatización, la solución del blanco contiene idéntica cantidad del reactivo o reactivos derivatizadores pero sin adición de la muestra. El objetivo es eliminar las interferencias que no provienen de la matriz, en este caso, la absorbancia producida por los disolventes y/o reactivos derivatizadores.

El blanco es la primera solución a la cual se mide la absorbancia y a partir de la señal obtenida se calibra el equipo a cero, por lo que, en lo adelante, el resto de las mediciones que se realicen a la muestra y a las soluciones patrones no consideran la absorbancia producida por los reactivos.

3.7.2. Métodos de cuantificación

El fundamento del análisis cuantitativo por espectrometría de absorción molecular es la ley de Lambert-Beer ($\boldsymbol{A = \varepsilon\, b\, c}$), que establece una proporcionalidad directa entre la absorbancia y la concentración.

Una particularidad de todos los métodos instrumentales de cuantificación es la necesidad de utilizar patrones de referencia del analito que se desea cuantificar, a los cuales se les mide la señal analítica (absorbancia en este caso) en idénticas condiciones experimentales a como se realiza la medición en la muestra. Así, la esencia de cualquier procedimiento de cuantificación es la comparación de la señal brindada por el analito con la señal brindada por uno o varios patrones de

referencia de concentración exactamente conocida.

Existen dos procedimientos básicos para realizar el análisis cuantitativo: el método del patrón externo y el método de la curva de calibración.

3.7.2.1. Método del patrón externo

El método del patrón externo es el procedimiento más sencillo de cuantificación, aunque también es el menos exacto. Consta de los siguientes pasos:

1. Preparación de la solución de la muestra según la metodología requerida para garantizar la ausencia de interferencias.
2. Preparación de una solución de un patrón de referencia del componente que se desea cuantificar, a una concentración exactamente conocida, en las mismas condiciones que a la muestra (disolvente, pH, temperatura, derivatización, etc.).
3. Medición de la absorbancia de la solución de la muestra y de la solución del patrón de referencia a la longitud de onda de máxima absorción.

Con los valores de absorbancia obtenidos para la muestra y el patrón de referencia se plantea la siguiente relación:

Concentración del patrón (C_{PR}) ---------- Absorbancia del patrón (A_{PR})

Concentración de la muestra (C_M) ---------- Absorbancia de la muestra (A_M)

entonces:

$$C_M = \frac{C_{PR} \; x \; A_M}{A_{PR}}$$

Veamos un ejemplo

La cuantificación de nitrito de sodio ($NaNO_2$) en productos cárnicos se fundamenta en la reacción de los nitritos con un reactivo derivatizador (Acido sulfanílico + Cloruro de α-Naftilamina) para producir un complejo coloreado que se mide a 520 nm.

El procedimiento analítico involucró la obtención de un extracto de la muestra del cual se tomaron 10 mL y se añadieron 10 mL del reactivo derivatizador. La solución se agitó y se dejó reposar durante 15 minutos al abrigo de la luz.

Para la cuantificación por el método de patrón externo se prepararon 10 mL de solución de patrón de referencia conteniendo 2 μg de $NaNO_2$ a la cual se añadieron igualmente 10 mL del reactivo derivatizador y se dejó reposar en oscuridad durante 15 minutos.

A ambas soluciones se les midió la absorbancia a 550 nm, obteniéndose valores de 0.42 y 0.47 para el patrón de referencia y la muestra, respectivamente.

entonces puede plantearse:

$$2\ \mu g \quad \text{----------} \quad 0.42$$

$$\mu g\ (muestra) \quad \text{----------} \quad 0.47$$

$$\mu g\ (muestra) = \frac{2\ \mu g\ \ x\ 0.47}{0.42}$$

$$\mu g\ (muestra) = 2.24\ \mu g\ NaNO_2$$

Está claro el valor de 2.24 μg representa el contenido de $NaNO_2$ en los 10 mL del extracto tomados para el análisis. Para calcular la concentración de $NaNO_2$ en el producto cárnico habría que considerar las variaciones de masa o concentración que se produjeron en el proceso de preparación de la muestra y obtención del extracto, aspectos estos que se han obviado en la presentación de este ejemplo.

El método del patrón externo presenta la limitante de asumir que la ley de Lambert-Beer se cumple en las condiciones experimentales empleadas y para los valores de concentración del patrón y la muestra, lo que no necesariamente es cierto pues como se sabe existen desviaciones químicas y físicas (ver epígrafe 3.3.1) que afectan la proporcionalidad entre la absorbancia y la concentración. De ahí que el procedimiento del patrón externo no es del todo exacto y se emplea únicamente en análisis rutinarios en los que se conoce aproximadamente la concentración del analito en la muestra (nótese que la concentración a la cual se preparó el patrón es similar a la encontrada en la muestra) y se tiene la certeza del cumplimiento de la ley fundamental de la absorción.

El procedimiento más exacto y más ampliamente utilizado en el análisis cuantitativo es el método de la curva de calibración.

3.7.2.2. Curva de calibración

Una curva de calibración es un procedimiento analítico que permite la cuantificación exacta y precisa del compuesto de interés por cuanto permite comprobar el cumplimiento de la ley de Lambert-Beer en las condiciones experimentales en que se realiza la determinación.

Los pasos generales para la realización de una curva de calibración son los siguientes:

1. Preparación de la solución de la muestra según la metodología requerida para garantizar la ausencia de interferencias.
2. Preparación de una serie de soluciones de un patrón del analito a concentraciones crecientes y exactamente conocidas en las mismas condiciones que la muestra (disolvente, pH, temperatura, derivatización, etc.). El número de soluciones puede estar comprendido entre 5 y 10 y las concentraciones se seleccionan de acuerdo con las cantidades esperadas del analito en la muestra.
3. Medición de la absorbancia de la solución de la muestra y de cada una de las soluciones de los patrones de referencia a la longitud de onda de máxima absorción.

Se obtiene entonces un juego de datos de concentración de las soluciones patrones vs. absorbancia, que en concordancia con la ley de Lambert-Beer (***A*** **=** ε ***b c***), debe responder a la ecuación de una recta del tipo

y = mx + a

donde

y es la absorbancia

m es la pendiente (ε ***b***) de la recta

x es la concentración

a es el intercepto, que este caso debe ser teóricamente igual a cero, dado que para cero concentraciones del patrón de referencia no debe obtenerse ningún valor de absorbancia.

4. A partir de los resultados experimentales obtenidos se aplica una regresión lineal simple con ayuda del método de los mínimos cuadrados para obtener la ecuación de regresión ***y = mx + a***.

Los términos m (pendiente) y a (intercepto) pueden ser calculados a través de las siguientes expresiones matemáticas:

$$m = \frac{\sum_{i=1}^{n} x_i y_i - \frac{\sum_{i=1}^{n} x_i \cdot \sum_{i=1}^{n} y_i}{n}}{\sum_{i=1}^{n} x_i^2 - \sum_{i=1}^{n} x_i} \qquad a = \frac{\sum y - m\sum x}{n}$$

Una vez obtenida la ecuación de la recta se sustituye el término ***"y"*** por la absorbancia de la muestra (A_M) y despejando se calcula el término ***"x"*** que es la concentración del analito en la muestra (***C_M***), según:

y = mx + a

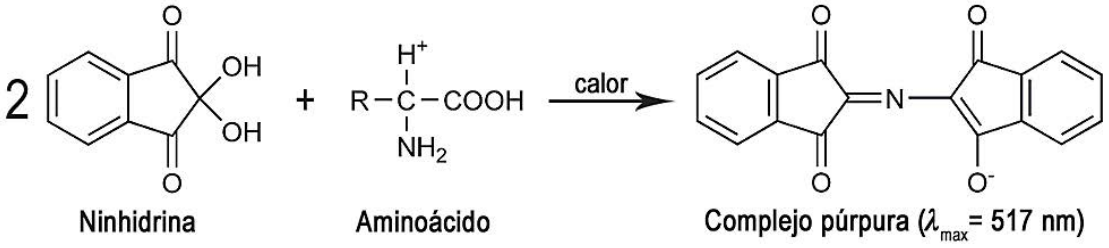
A_M = m C_M + a

$$C_M = \frac{A_M - a}{m}$$

Veamos un ejemplo:

Se desea determinar el contenido del aminoácido prolina en una muestra de jugo de uvas. El principio de la determinación radica en que todos los aminoácidos al reaccionar con una solución de ninhidrina forman un complejo coloreado (púrpura), cuya absorbancia se lee a 517 nm.

La siguiente ecuación ilustra la reacción considerada:



Ninhidrina Aminoácido Complejo púrpura (λ_{max}= 517 nm)

El procedimiento de determinación es el siguiente

1. Tomar 0,5 mL de una muestra diluida e introducirla en un tubo de ensayo con tapón de rosca, añadir 0,25 ml de Acido Fórmico 98% y 1 mL de solución de Ninhidrina al 3%. Cerrar herméticamente el tubo e introducirlo en un baño de agua hirviendo durante catorce o quince minutos.
2. Preparar una curva de calibración con soluciones de un patrón de referencia de prolina a concentraciones de 5, 10, 15, 20, 25 y 30 mg/L. Añadir a cada una de las soluciones de los patrones 0,25 mL de Acido Fórmico 98% y 1 mL de solución de Ninhidrina al 3%. Cerrar herméticamente el tubo e introducirlo en un baño de agua hirviendo durante catorce o quince minutos.
3. Medir la absorbancia de la solución de muestra y las soluciones de los patrones a 517 nm contra un blanco que contiene 0.25 mL de agua y el resto de los reactivos descritos anteriormente.

Supongamos que se obtuvieron los siguientes resultados de las lecturas de la curva de calibración:

Soluciones patrón de prolina	***1***	***2***	***3***	***4***	***5***	***6***
Concentración (mg/L)	5	10	15	20	25	30
Absorbancia	0.095	0.2	0.28	0.37	0.48	0.57

y que la absorbancia obtenida para la solución de la muestra fue 0.41

Al aplicar la regresión lineal y calcular los valores de pendiente (***m***) e intercepto (***a***), se obtuvo la siguiente ecuación:

y = 0.0189 x + 0.002

sustituyendo el término ***"y"*** por el valor de absorbancia de la muestra (0.41) y despejando, quedaría

$$x = \frac{0.41 - 0.002}{0.0189}$$

$$x = 21.59\ mg\ prolina / L$$

Sin embargo, el objetivo de la realización de una curva de calibración es precisamente comprobar el cumplimiento de la ley de Lambert-Beer en el intervalo de concentraciones seleccionado, con vistas a garantizar la cuantificación precisa del componente objeto de determinación.

Entonces es necesario, a partir de los resultados experimentales, comprobar la

proporcionalidad existente entre la concentración y la absorbancia, para lo cual se calcula el coeficiente de determinación (***R²***) empleando la siguiente expresión:

$$R^2 = \frac{\left(\sum x_i\, y_i - \frac{\sum x_i \sum y_i}{n}\right)^2}{\sum x_i^{\,2} - \frac{\left(\sum x_i\right)^2}{n}} \Bigg/ \sum y_i^{\,2} - \frac{\left(\sum y_i\right)^2}{n}$$

La importancia práctica del coeficiente de determinación (***R²***) puede resumirse como sigue:

- Si ***R² = 0***, la regresión lineal no explica la dependencia entre X y Y, lo que significa que ambas variables se relacionan por otra función o no se relacionan.
- Si ***R² = 1***, entonces el modelo de regresión lineal se ajusta totalmente a los datos, es decir la ecuación refleja perfectamente la dependencia entre X y Y.
- Si ***0 < R² < 1***, la regresión explica parte del error y quedan errores no explicados o residuos, lo que constituye el caso más común en la práctica.

En resumen, el coeficiente de determinación ***R²***, mide la "*bondad de ajuste"* del modelo de regresión. Mientras más cercano esté a 1, significa que hay un mejor ajuste entre el modelo lineal y los datos experimentales. Esto implica que la recta de regresión describe más eficientemente la relación entre las dos variables en estudio, en este caso la absorbancia y la concentración, por lo que constituye una medida del grado de cumplimiento de la Ley de Lambert-Beer.

Para el ejemplo considerado, se obtuvo un valor de ***R²*** igual a 0.9984, lo que denota la existencia de una excelente proporcionalidad entre la absorbancia y la concentración, por cuanto la regresión explica el 99.84 % del error total.

Aunque el coeficiente de determinación es el parámetro más utilizado para evaluar la recta de regresión, su determinación no constituye una prueba concluyente, por lo que en una investigación rigurosa, deben realizarse otras pruebas para confirmar el ajuste de la ecuación de regresión a los datos experimentales.

El ***Test de Fisher o Anova Simple*** es la más importante prueba de significación de la regresión lineal simple. Si la prueba resulta significativa, indicará que la porción del error explicada por la regresión es significativamente mayor que la porción no explicada. Esto asegura un buen ajuste del modelo a los datos.

En el ejemplo considerado, los resultados del ***Anova Simple*** para la regresión se muestran en la tabla 3.3.

Tabla 3.3. Resultados del Anova Simple para la regresión.

	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico de F
Regresión	1	0,15604	0,15604321	2555,09	$9{,}1665 \times 10^{-7}$
Residuos	4	0,00024	$6{,}1071 \times 10^{-5}$		
Total	5	0,15629			

Obsérvese que el valor de F experimental es mucho mayor que el valor de F crítico ($2555{,}09 > 9{,}1665 \times 10^{-7}$) por lo que puede afirmarse que el Anova es significativo, lo que implica una buena linealidad de la recta de regresión y por tanto un buen ajuste de los datos al modelo.

Sin embargo, estos resultados no son suficientes para afirmar que los valores obtenidos son confiables, sino que el cumplimiento de Lambert-Beer requiere además determinar la significación de la ***pendiente*** y del ***intercepto***.

La prueba de significación de la ***pendiente*** brinda información acerca de la variación (incremento o disminución) de los valores de "*y*" en la medida en que aumentan los valores de "*x*", es decir, si la pendiente resulta significativa quiere decir que en la medida en que se incrementa la concentración de prolina se incrementan también significativamente los valores de absorbancia.

En el caso del ***intercepto***, según la ley de Lambert Beer, este debe ser igual a cero o hablando en términos estadísticos, el intercepto debe ser *no significativo,* es decir, que el valor obtenido en la ecuación de la recta (0.002 en el ejemplo que nos ocupa) debe ser significativamente igual a cero.

En el ejemplo considerado, al realizar pruebas de hipótesis para un nivel de confianza del 95 % (α= 0.05) se obtuvieron los resultados que se muestran en la tabla 3.4.

Tabla 3.4. Resultados de las pruebas de hipótesis (α= 0,05) para la pendiente y el intercepto

	Coeficientes	Error típico	Estadístico t	Significación
Intercepto	0,002	0,007275	0,2749	0,797
Pendiente	0,0189	0,000374	50,5479	$9{,}17 \times 10^{-7}$

Nótese que se obtuvo una significación para la pendiente de $9{,}17 \times 10^{-7}$ (< 0.05), corroborándose que la misma resulta significativa, mientras para el intercepto la significación fue 0.797 (> 0.05), por lo que puede afirmarse que el mismo no difiere significativamente del valor cero. Ambos resultados, unidos a la linealidad demostrada por $\boldsymbol{R^2}$ y el ***Anova de la regresión***, corroboran el cumplimiento de la ley de Lambert-Beer y por lo tanto la ecuación de regresión obtenida puede emplearse para el cálculo de la concentración de prolina.

Un resumen del ejemplo considerado se muestra en las figuras 3.13a y 3.13b.

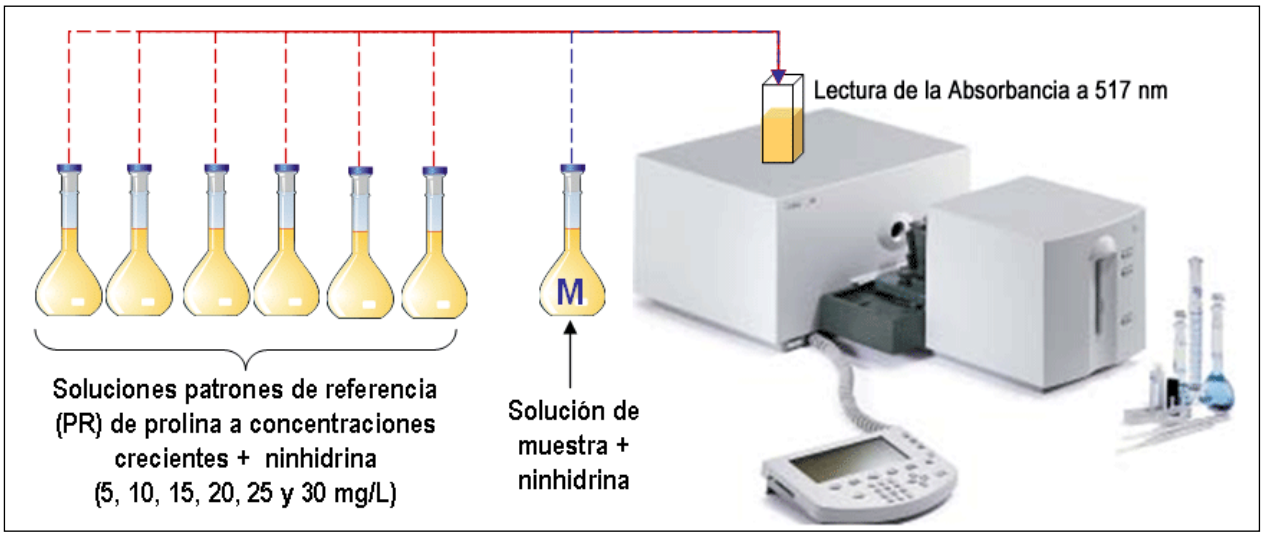


Figura 3.13a. Representación esquemática del procedimiento de curva de calibración para la determinación de prolina en jugo de uvas.

mg/L de patrón de referencia de Prolina	Absorbancia
5	0.095
10	0.20
15	0.28
20	0.37
25	0.48
30	0.57
Muestra	**0.41**

$$x = \frac{0.41 - 0.002}{0.0189}$$

$$x = 21.59\ mg\ prolina / L$$

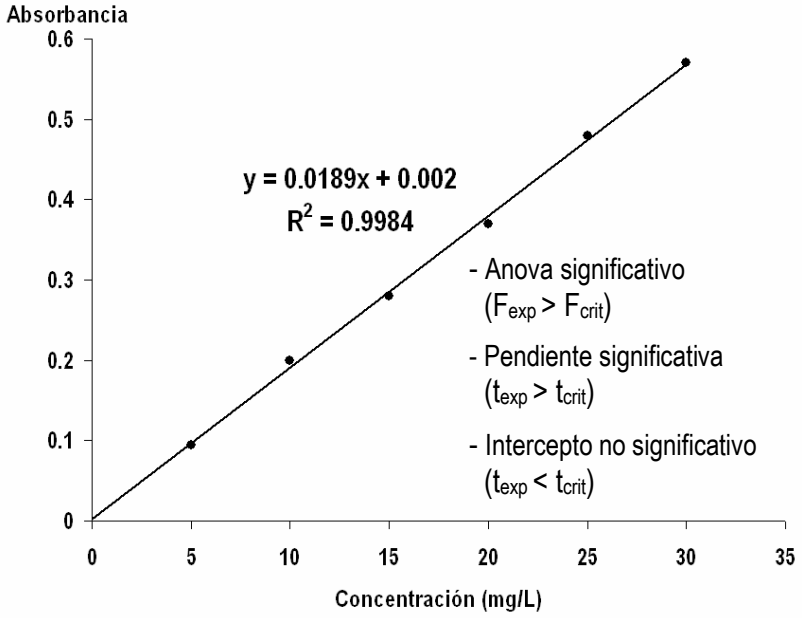


Figura 3.13b. Resultados obtenidos en el procesamiento de los datos experimentales de curva de calibración por el método de regresión lineal simple para la determinación de prolina en jugo de uvas.

En resumen, para verificar el ajuste del modelo a los resultados experimentales (en este caso el cumplimiento de la ley de Lambert Beer) deben realizarse un conjunto de pruebas estadísticas y solo cuando se cumplan los supuestos de las pruebas de significación fundamentales para el análisis de regresión la ecuación obtenida puede emplearse para la obtención de resultados confiables en el cálculo de la concentración del analito. Un resumen de estas pruebas estadísticas se muestra en la tabla 3.5.

Tabla 3.5. Parámetros estadísticos a considerar para verificar el ajuste del modelo a los resultados experimentales en una curva de calibración.

Parámetros estadísticos	Resultados que expresan el ajuste del modelo	Significado práctico de los parámetros estadísticos calculados
Coeficiente de determinación (R^2)	Cercano al valor 1 En la práctica científica se plantea que para métodos espectrofotométricos R^2 debe ser ≥ 0,99	Expresa linealidad. Indica la proporción entre el error explicado por la regresión con respecto al error total.
Anova simple de la regresión	Significativo	Expresa linealidad. Indica la proporción entre el error explicado por la regresión con respecto al error no explicado.
Prueba de hipótesis para la pendiente	Pendiente significativa	Expresa la variación significativa de la señal analítica (Absorbancia, Transmitancia, Fluorescencia, etc) con el incremento de la concentración de los patrones de referencia.
Prueba de hipótesis para el intercepto	Intercepto no significativo	Expresa que la recta parte del origen, es decir, que el intercepto es igual a cero.

Finalmente debe señalarse que en la actualidad se emplean para estos cálculos programas estadísticos especializados que realizan estas y otras muchas operaciones con gran velocidad y eficiencia. Entre los más populares se encuentra *Microsoft Excel*, del paquete *Microsoft Office*, en cualquiera de sus versiones y uno de los más potentes es el software *SPSS for Windows* por la gran variedad de pruebas estadísticas que puede realizar.

3.8. APLICACIONES EN EL ANÁLISIS DE LOS ALIMENTOS

La espectrometría de absorción molecular UV-visible presenta múltiples aplicaciones en el análisis de un gran número de compuestos en los alimentos constituyendo una poderosa herramienta para el análisis cuantitativo. En la tabla 3.6, se relacionan algunas de estas aplicaciones con las condiciones de trabajo más importantes.

Tabla 3.6.

Algunas aplicaciones de la espectrometría UV-vis en el análisis de alimentos.

Analito	Alimentos	Condiciones experimentales	λ trabajo
Nitratos	Aguas	Absorción de la radiación ultravioleta por el ión nitrato.	275 nm
Amonio	Aguas	Formación de un complejo amarillo-pardo rojizo $I(NH_2)Hg$ que se obtiene cuando se mezcla el reactivo de Nessler ($I_2Hg.2IK$) con una solución acuosa conteniendo ión amonio. La intensidad del color es función del ión amonio presente, y se determina por colorimetría.	410 nm
Boro	Aguas	Determinación de la cantidad de boro, mediante espectrofotometría, previa reacción con azometino.	410 nm

Analito	Alimentos	Condiciones experimentales	λ trabajo
Metanol	Bebidas alcohólicas	Oxidación del alcohol metílico a formaldehído por potasio permanganato en presencia de ácido fosfórico y medida espectrofotométrica de la reacción coloreada del formaldehído con ácido cromotrópico. Coloración violeta específica del formaldehído.	575 nm
Almidón	Cereales	Extracción de azúcares simples con etanol caliente 80%, permaneciendo el almidón. El residuo de almidón se solubiliza con ácido perclórico diluido, y medida espectrofotométrica del color desarrollado al calentarlo con el reactivo antrona-ácido sulfúrico.	630 nm
Anhídrido sulfuroso	Cerveza	El SO_2 se destila en medio ácido y se lleva a una solución tamponada de DTNB (Ditiobis-Acido Nitrobenzoico) por medio de una corriente de nitrógeno. El producto formado en la reacción se mide por espectrofoto-metría.	415 nm
Azúcares reductores	Compotas, mermeladas y jaleas	Formación de óxido cuproso por reacción de los azúcares con cobre (II) en medio alcalino. Reacción del óxido cuproso con ácido arsenomilíbdico y medición espectrofotométrica del ácido arsenomolibdoso resultante de la reacción.	550 nm
Prolina	Jugo de uvas	Determinación cuantitativa de la prolina por reacción con ninhidrina en medio ácido.	517 nm
Actividad fosfatasa	Leche	La actividad de la fosfatasa de la leche en polvo se determina por el poder de la fosfatasa de liberar el fenol de fenilfosfato disódico. Se mide la cantidad de fenol liberado en las condiciones prescritas, por la medida espectrofotométrica de la coloración, desarrollada con el reactivo de Gibbs.	610 nm
Hidroxiprolina	Productos Cárnicos	Previa hidrólisis en medio ácido de las proteínas y oxidación de la hidroxiprolina. El derivado formado con el p-dimetilamino-benzaldehído se valora colorimétricamente.	560 nm
Nitritos	Productos Cárnicos	Reacción de los nitritos con ácido sulfanílico y α-naftilamina, y lectura de la intensidad de la coloración obtenida mediante espectrofoto-metría.	520 nm
Fósforo	Productos Cárnicos, Cereales, Lácteos	Transformación del fósforo en ácido pirofosfórico, posterior hidrólisis del mismo y medida del color producido al añadirle el reactivo molibdato-vanadato.	436 nm
Esteres	Rones	Reacción cuantitativa de los ésteres con hidroxilamina en solución alcalina, formación de ácido hidroxámico, acidificación, formación de un complejo coloreado con iones férricos y medida del color desarrollado	525 nm

Analito	Alimentos	Condiciones experimentales	λ trabajo
Furfuraldehído	Rones	Destilación y posterior medida espectrofotométrica.	277 nm
Etanal	Sidra	El etanal se determina en la sidra, previamente decolorada con carbón, midiendo la coloración verde o violeta que da con el sodio nitroprusiato y la piperidina.	570 nm
Cobre	Varios	El sodio dietilditiocarbamato reacciona con el cobre (reacción de Delepine), dando la sal correspondiente a este metal y coloración amarilla oro, cuya intensidad se mide por colorimetría o espectrofotometría.	420 nm
Hierro	Varios	El hierro oxidado por el agua oxigenada se combina con el ion sulfociánico en medio clorhídrico. El color rojo se mide por espectrofotometría.	508 nm
2,3 butanodiol	Vinos	El 2,3-butanodiol separado del vino, previa defecación, por extracción con acetona, se oxida con ácido peryódico a acetaldehído. La reacción coloreada del acetaldehído con el sodio nitroprusiato y la piperidina permite la determinación espectrofotométrica.	270 nm
Ácido benzoico	Vinos	Extracción por el éter del ácido benzoico presente en el vino. Tratamiento del extracto por la mezcla nitro-sulfúrica y formación del ácido 3,5- dinitrobenzoico, que es extraído con éter y después recogido por la mezcla acetona-alcohol. La adición de hidróxido de sodio da origen a una coloración violeta.	570 nm
Ácido sórbico	Vinos	En la destilación del vino para la determinación de la acidez volátil el ácido sórbico pasa casi en su totalidad al destilado junto con el ácido acético, falseando el resultado del análisis. Para valorar este ácido sórbico se parte de una muestra de 0,5 ml de destilado (lo que no supone un error sensible) y se valora por espectrofotometría en el ultravioleta.	256 nm

Trabajo Independiente

1. *Consulte los apéndices B-1, B-3, B-4, B-5 y B-6, en los que aparece un resumen del presente capítulo. Céntrese en los elementos relacionados con la absorción molecular UV-Vis.*
2. *Resuelva los ejercicios 1, 2 y 3 que aparecen en el **Capítulo 14 / epígrafe 14.1. Ejercicios propuestos**, así como el ejercicio 9 del mismo epígrafe, centrándose en este último caso en el análisis de las técnicas 1 y 2 (Determinación de anhídrido sulfuroso en cerveza y determinación de almidón en productos cárnicos).*
3. *Resuelva el ejercicio 1 que aparece en el Capítulo **14 / epígrafe 14.3. Análisis de documentación científica**.*

BIBLIOGRAFÍA

1. Analíticos en Alimentaria. Métodos Oficiales de Análisis. Aguas potables de consumo público y aguas de bebidas envasadas. Ed. Panreac Química SA, 1999.
2. Analíticos en Alimentaria. Métodos Oficiales de Análisis. Carne y productos cárnicos. Ed. Panreac Química SA, 1999
3. Analíticos en Alimentaria. Métodos Oficiales de Análisis. Cereales, derivados de cereales y cerveza. Ed. Panreac Química SA, 1999
4. Analíticos en Alimentaria. Métodos Oficiales de Análisis. Leche y productos lácteos. Ed. Panreac Química SA, 1999
5. Analíticos en Alimentaria. Métodos Oficiales de Análisis. Productos derivados de la uva, aguardientes y sidra. Ed. Panreac Química SA, 1999.
6. McLeod, J. A. (1973). Instrumental Methods of Food Analysis. Elek Science. London.
7. Pina, G. y Dorojova, E. (1991). Temas de Análisis Instrumental I. Tomo IV. ENPES. La Habana. Cuba.
8. Polo, J. C. (2009). Regresión lineal simple. Comunicación personal. Instituto de Farmacia y Alimentos. Universidad de La Habana. Cuba.
9. Rubinson, K & Rubinson, J. (2001). Análisis Instrumental. Pearson Educación SA. Madrid
10. Sierra, M; Gómez, S; Morante, S; Pérez, D; Sanchez, A; Gañan, J. (2015). Análisis Instrumental. Experiencia de Innovación Docente en la URJC. Ed. Dykinson. Madrid.
11. Skoog, D; Holler, J; Crouch, S. (2008). Principios de análisis instrumental. 6ta ed. Cengage Learning Editores.

4 Espectrometría de absorción atómica

La espectroscopia atómica estudia la absorción o emisión de radiación electromagnética por las partículas atómicas. Si se suministra una determinada cantidad de energía a un átomo que se encuentra en su estado fundamental de energía, E_0, esta energía es absorbida por el átomo saltando un electrón situado en la capa electrónica exterior a un nivel energético superior, alcanzando el átomo un nuevo estado energético E_1.

La cantidad de energía para pasar del estado E_0 al estado E_1 se conoce como **energía de excitación** y puede suministrarse térmicamente, eléctricamente, por inducción electromagnética, por radiaciones de diversa naturaleza, etc. Cuando el átomo vuelve al estado fundamental cede una cantidad de energía idéntica a la de excitación, emitiendo radiaciones de una determinada longitud de onda (figura 4.1).

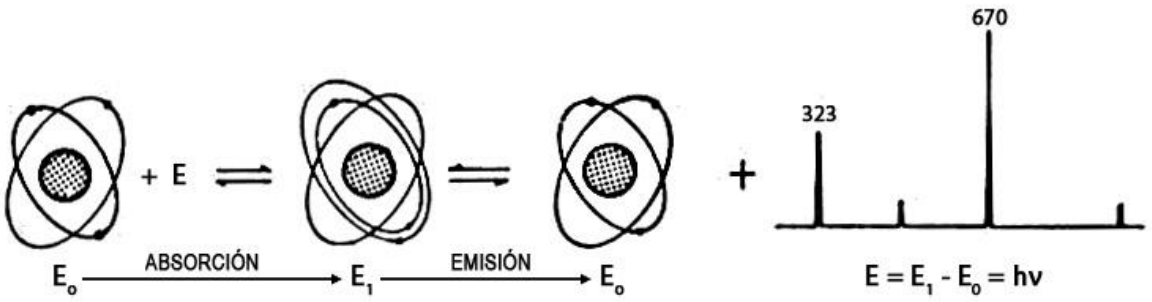


Figura 4.1. Procesos de absorción y emisión atómica.

En el análisis de los alimentos se emplean dos técnicas fundamentales para trabajar en espectroscopia atómica: absorción atómica y emisión atómica. En **absorción** atómica se mide la energía absorbida por los átomos para pasar del estado fundamental al estado excitado mientras que en **emisión** se mide la energía liberada al pasar de estados excitados al estado fundamental. Existe una tercera aplicación conocida como espectroscopia de **fluorescencia** atómica, que se produce cuando la radiación absorbida, de una determinada frecuencia, por los átomos en el estado fundamental, es parcialmente reemitida como radiación de fluorescencia, es decir, la radiación emitida es menor que la absorbida, pero en este texto solo se abordarán las dos primeras.

En este capítulo se considerarán los principios generales y aplicaciones analíticas fundamentales de la espectrometría de absorción atómica.

4.1. PRINCIPIOS GENERALES DE LA ESPECTROMETRÍA DE ABSORCIÓN ATÓMICA

La espectroscopia de absorción atómica (a menudo llamada EAA) es un método instrumental de la Química Analítica que determina una gran variedad de elementos metálicos, siendo capaz de detectar y determinar cuantitativamente la mayoría de los elementos del sistema periódico. Sus campos de aplicación son, por tanto, muy diversos. Se emplea en el análisis de aguas, análisis de suelos, bioquímica, toxicología, medicina, industria farmacéutica, industria alimentaria, industria petroquímica, etc.

La concentración del analito se determina a partir de las medidas de absorción producidas por los átomos libres de un elemento en particular, a la longitud de onda de absorción específica de este elemento. La conversión del analito en átomos neutros se logra cuando la muestra es quemada en una llama o en un horno de grafito.

En otras palabras, la espectrometría de absorción atómica se basa en la *absorción de energía radiante de las zonas de UV o el visible por átomos libres o neutros en estado gaseoso del elemento que se analiza, producidos por la energía térmica de una llama o de una superficie sólida con alta temperatura.*

A fin de explicar los principios generales de la absorción atómica, partamos de los componentes fundamentales de un espectrómetro de absorción atómica y de los procesos fundamentales que ocurren en el mismo.

Los instrumentos para espectrometría de absorción atómica (EAA) constan de manera general de una *fuente de radiación*, un *sistema de atomización de la muestra*, consistente en una llama o en un horno de grafito, un *selector de longitud de onda*, un *detector* y un *procesador de la señal y de la lectura de salida*.

La *muestra*, convenientemente preparada y generalmente en disolución, es introducida en el *sistema de atomización* en el cual, por acción de las altas temperaturas de la llama o del horno electrotérmico, se vaporiza y se convierte en átomos libres correspondientes a todos los elementos presentes inicialmente en ella.

Sobre el vapor atómico originado se hace incidir radiación electromagnética proveniente de una *fuente* que emite radiación monocromática de potencia P_o de la misma longitud de onda del elemento que se pretende analizar, provocando que los átomos del analito absorban parte de esta radiación en función de su concentración y se exciten pasando a un estado energético superior.

La potencia no absorbida P_t llega a un *selector de longitud de onda* en el que se ha seleccionado la longitud de onda correspondiente a la línea de absorción de analito (que es idéntica a la emitida por la fuente). La función de este dispositivo

es eliminar las interferencias producidas por la emisión de radiación de la llama, evitando que éstas lleguen al detector y falseen la determinación.

A continuación del *selector de longitud de onda* se coloca un *detector*, generalmente un tubo fotomultiplicador, capaz de transformar, en relación proporcional, las señales de intensidad de radiación electromagnética en señales eléctricas o de intensidad de corriente, las cuales llegan al *procesador de señal*, que es por lo general un dispositivo electrónico que amplifica la señal eléctrica generada por el *detector* y registra el valor de absorbancia y/o transmitancia. De forma análoga a lo explicado para los procesadores de señales en absorción molecular, en la actualidad el registro de la señal de absorbancia y la transmitancia se acopla a sistemas computarizados que con ayuda de potentes softwares almacenan la información y realizan cálculos cuantitativos entre otras funciones.

La figura 4.2 muestra un esquema general del equipo y de los procesos fundamentales que ocurren en el mismo.

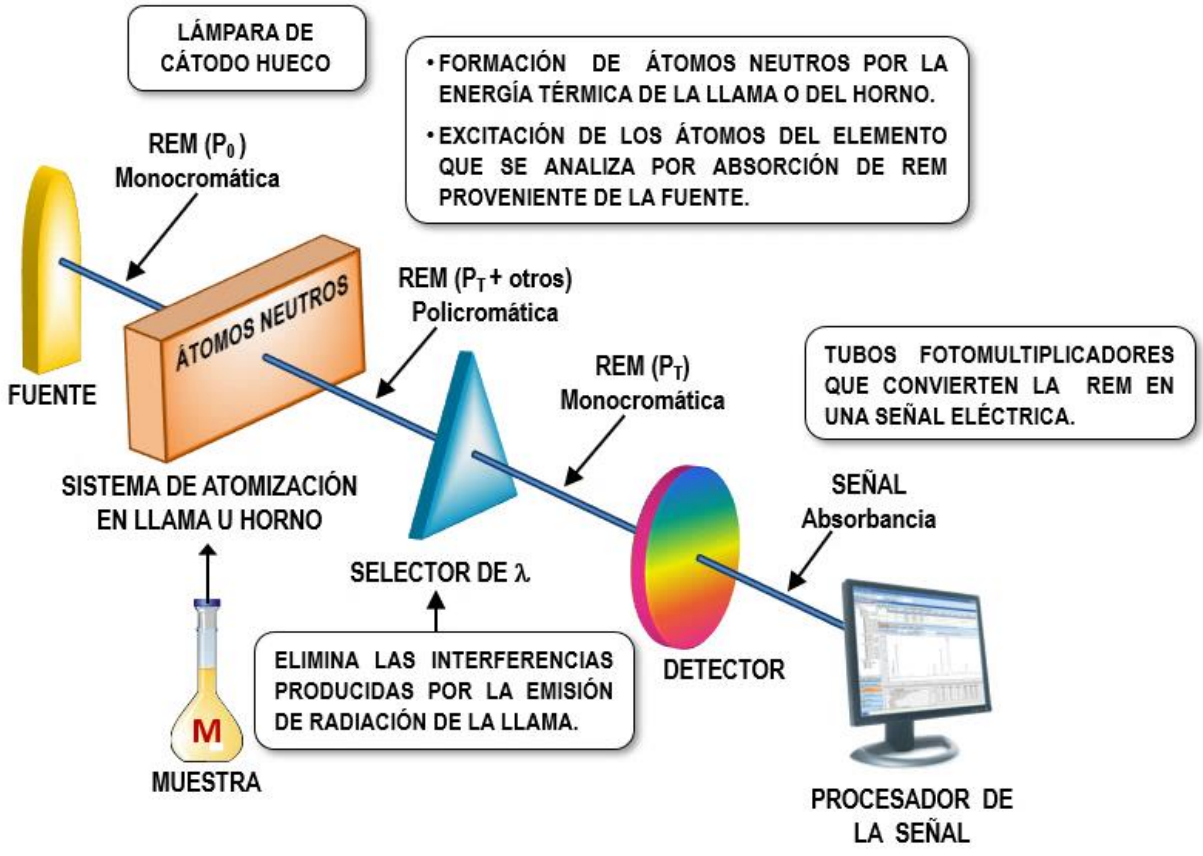


Figura 4.2. Componentes básicos y procesos en un espectrómetro de absorción atómica.

Teniendo en cuenta la significativa importancia que reviste el proceso de atomización de la muestra y las particularidades en la construcción y características de la fuente de radiación empleada en la espectrometría de absorción atómica se profundizará a continuación en estos dos aspectos.

4.2. TÉCNICAS DE ATOMIZACIÓN DE LA MUESTRA

Existen dos métodos fundamentales de atomización de la muestra: la atomización con llama y la atomización electrotérmica con un horno de grafito.

4.2.1. Atomización con llama

En un atomizador de llama, la disolución de la muestra es nebulizada mediante un flujo de gas oxidante, mezclado con el gas combustible, y se transporta a una llama donde se produce la atomización. Como se muestra en la figura 4.3, una serie compleja de procesos encadenados tiene lugar en la llama. El primero es la desolvatación, en el que se evapora el disolvente hasta producir un aerosol molecular sólido finamente dividido. Luego ocurre la disociación de la mayoría de estas moléculas y se produce un gas atómico. La mayoría de los átomos así formados se ionizan originando cationes y electrones. Indudablemente se producen también otras moléculas y átomos en la llama como resultado de las interacciones del gas combustible con el gas oxidante y con las distintas especies de la muestra. Como se indica en la figura 4.3 una fracción de las moléculas, átomos e iones también se excita por el calor de la llama, produciéndose así espectros de emisión moleculares, atómicos e iónicos. Produciéndose tantos procesos complejos, no es sorprendente que la atomización sea la etapa más crítica en la espectroscopia de llama y la que limita la precisión de dichos métodos. Debido a la naturaleza crítica de la etapa de atomización, es importante comprender las características de las llamas y las variables que afectan a dichas características.

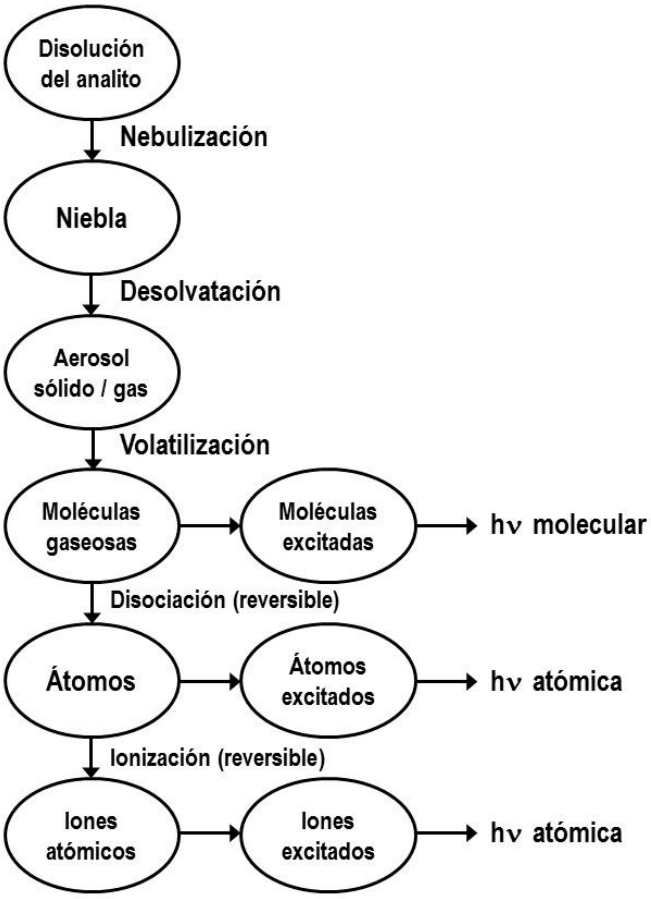


Figura 4.3. Procesos que tienen lugar durante la atomización

Tipos de llamas

En la tabla 4.1 se enumeran los combustibles y oxidantes más comunes utilizados en espectroscopia de llama y los intervalos aproximados de temperatura alcanzados con cada una de estas mezclas. Hay que destacar que cuando se utiliza el aire como oxidante se obtienen temperaturas de 1700 a 2400 °C con varios combustibles. A estas temperaturas sólo las muestras que se

descomponen fácilmente se atomizan. Para la mayoría de las muestras refractarias, se debe emplear oxígeno u óxido nitroso como oxidante. Estos oxidantes producen temperaturas de 2500 a 3100 °C con los combustibles habituales.

Tabla 4.1. Propiedades de las llamas

Combustible	Oxidante	Temperaturas (ºC)	Velocidad de combustión máxima (cm/s)
Gas natural	Aire	1700 – 1900	39 – 43
Gas natural	Oxígeno	2700 – 2800	370 – 390
Hidrógeno	Aire	2000 – 20100	300 – 440
Hidrógeno	Oxígeno	2550 – 2700	900 – 1400
Acetileno	Aire	2100 – 2400	158 – 266
Acetileno	Oxígeno	3050 – 3150	1100 – 2480
Acetileno	Óxido nitroso	2600 – 2800	285

Las velocidades de combustión indicadas en la cuarta columna de la tabla 4.1 son de considerable importancia, porque las llamas sólo son estables en ciertos intervalos de caudal. Si el caudal no sobrepasa la velocidad de combustión, la llama se propaga hacia el interior del quemador dando un fogonazo. Cuando el caudal aumenta, la llama sube hasta alcanzar un punto por encima del quemador donde el caudal y la velocidad de combustión son iguales. En esta región es donde la llama es estable. A caudales más elevados, la llama sube y al final alcanza un punto donde se aparta del mechero y se apaga. Estas consideraciones ponen de relieve la importancia de controlar el caudal de la mezcla combustible/oxidante. Este caudal depende mucho del tipo de combustible y de oxidante utilizados.

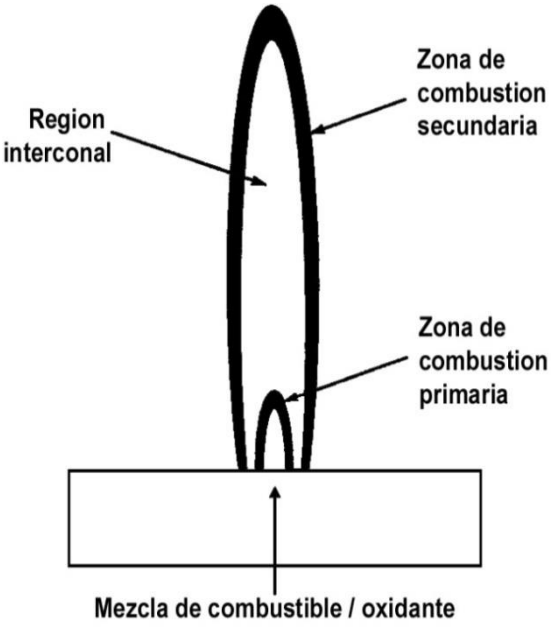


Figura 4.4. Regiones en una llama

Estructura de la llama

Como se muestra en la figura 4.4 las regiones más importantes de la llama son la zona de combustión primaria, la región interconal y la zona de combustión secundaria. El aspecto y el tamaño relativo de estas regiones varían considerablemente con la relación combustible-oxidante, así como con el tipo de combustible y de oxidante. La zona de combustión primaria en una llama de hidrocarburos se reconoce por su coloración azul que proviene de los espectros de bandas de C_2, CH y otros

radicales. En general, en esta zona no se alcanza el equilibrio térmico y, por ello, esta zona rara vez se utiliza en espectrometría de llama.

La región interconal, que es relativamente estrecha en llamas de hidrocarburo estequiométricas puede alcanzar varios centímetros de altura con fuentes ricas en combustible de acetileno/oxígeno o acetileno/óxido nitroso. La zona es frecuentemente rica en átomos libres y es la parte de la llama más ampliamente utilizada en espectroscopia. En la zona de combustión secundaria, los productos formados en la región interior se convierten en óxidos moleculares estables que se dispersan por los alrededores.

El perfil de la llama proporciona información útil respecto a los procesos que tienen lugar en las distintas partes de la llama; es una representación de contornos que muestra las regiones de la llama donde una variable de interés tiene valores similares. Algunas de estas variables son la temperatura, la composición química, la absorbancia y la intensidad radiante.

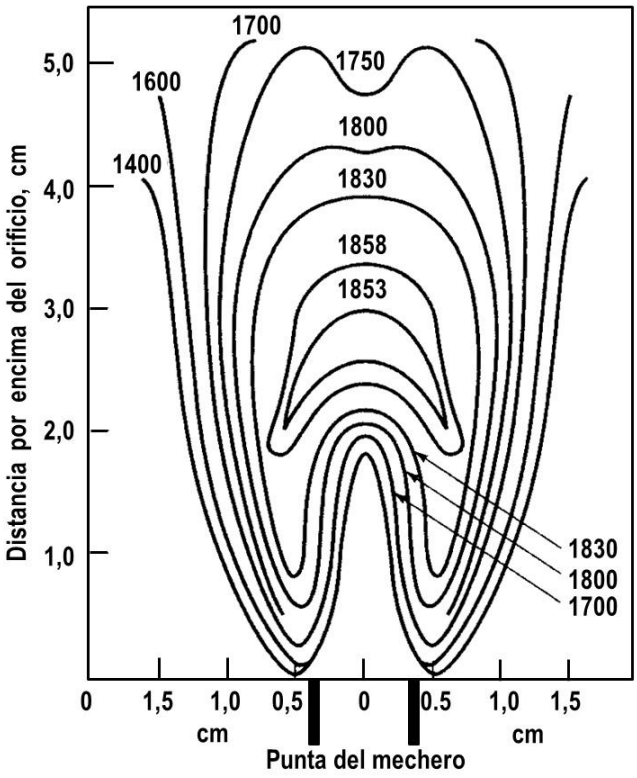


Figura 4.5. Perfiles de temperatura en ºC en una llama de gas natural / aire

Perfiles de temperatura.

La figura 4.5 muestra el perfil de temperatura de una llama característica para espectroscopia atómica. La temperatura máxima se localiza aproximadamente 1 cm por encima de la zona de combustión primaria de la llama. Es importante, especialmente en los métodos de emisión, enfocar la misma parte de la llama con la rendija de entrada en todas las medidas analíticas y de calibración.

Perfiles de absorbancia de la llama.

Los perfiles de absorción de diferentes elementos difieren también en función de la zona de la llama en que se encuentres. Así, por ejemplo, el magnesio presenta un máximo de absorbancia aproximadamente a la mitad de la llama debido a dos efectos opuestos. Primeramente, ocurre un aumento inicial de la absorbancia a medida que la distancia a la base de la llama aumenta, lo que se debe al gran número de átomos de magnesio producidos por el mayor tiempo de exposición al calor de la llama, sin embargo, al acercarse a la zona secundaria de combustión comienza una apreciable oxidación del magnesio; este proceso origina el consiguiente descenso de la absorbancia, ya que las partículas de óxido formadas

no absorben a la longitud de onda empleada. Por ello, para obtener la máxima sensibilidad analítica, la llama debe ajustarse con respecto al haz hasta obtener una absorbancia máxima.

El comportamiento de otros metales es bastante diferente, así por ejemplo, la plata, la cual no se oxida fácilmente evidencia un aumento continuo del número de átomos y por tanto de la absorbancia desde la base hasta la periferia de la llama. Por el contrario, el cromo, que forma óxidos muy estables, muestra una disminución continua de la absorbancia desde una zona próxima al extremo del mechero, lo que sugiere que la formación de óxidos predomina desde el principio. Obviamente, para el análisis de cada uno de estos elementos se debería utilizar una zona distinta de la llama. De ahí que el ajuste de la posición de la llama respecto a la rendija de entrada es, por tanto, una operación crítica que determina en gran medida los resultados del análisis.

Atomizadores de llama

Los atomizadores de llama se emplean en espectroscopia de emisión y absorción atómica. La figura 4.6 muestra el diagrama de un típico mechero de flujo laminar de fabricación comercial que emplea un nebulizador de tubo concéntrico. El aerosol, formado por el flujo del gas oxidante, se mezcla con el combustible y pasa a través de una serie de deflectores que eliminan las gotitas de disolución que no sean muy finas. Como consecuencia de la acción de estos deflectores la mayor parte de la muestra se recoge en el fondo de la cámara de mezcla, donde se drena hacia un contenedor de desechos. El aerosol, el oxidante y el combustible se queman pues en un mechero provisto de una ranura que produce una llama que generalmente mide entre 5 y 10 cm de longitud.

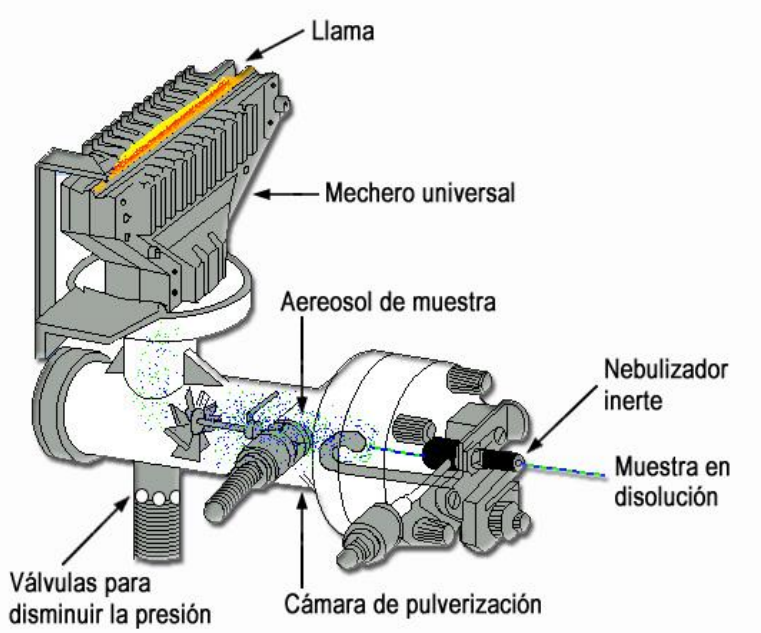


Figura 4.6. Mechero de flujo laminar

Los mecheros de flujo laminar proporcionan una llama relativamente estable y larga. Estas propiedades tienden a aumentar la sensibilidad y la reproducibilidad. La cámara de mezcla en este tipo de mechero contiene una mezcla potencialmente explosiva, que se puede prender por cl retroceso de la llama, si su caudal es demasiado bajo. Obsérvese que, por esta razón, el mechero de flujo laminar mostrado en la figura 4.6 está equipado con unas válvulas para disminuir la presión.

Reguladores de combustible y oxidante.

En la espectroscopia de llama los caudales de oxidante y de combustible constituyen variables importantes que requieren un control preciso. Es deseable poder variar cada uno de ellos en un intervalo amplio para poder encontrar experimentalmente las condiciones óptimas para la atomización. Por lo general, el combustible y el oxidante se combinan aproximadamente en una proporción estequiométrica.

Sin embargo, en la determinación de metales que forman óxidos estables es más conveniente el empleo de una llama que contenga un exceso de combustible. Los caudales se controlan, por lo general, por medio de reguladores de presión del doble diafragma seguidos de válvulas de agujas situadas en el instrumento. El sistema de medida de caudal más empleado es el rotámetro, que consiste en un tubo cónico, graduado y transparente montado verticalmente con su extremo más estrecho hacia abajo. El flujo de gas levanta un flotador liviano, cónico o esférico, cuya posición vertical está determinada por el caudal de gas.

Características de funcionamiento de los atomizadores de llama.

En términos de reproducibilidad la atomización con llama resulta ser superior a todos los demás métodos que se han desarrollado hasta ahora para la introducción de muestras líquidas. Sin embargo, en términos de eficacia en la introducción de la muestra y, por ello, de sensibilidad, otros métodos de atomización son claramente mejores. Pueden citarse dos razones para la menor eficacia de la introducción de la muestra en la llama. En primer lugar, una gran porción de la muestra se pierde por el drenaje. En segundo lugar, el tiempo de residencia de los átomos individuales en el camino óptico en la llama es breve (aproximadamente 10^{-4} s).

4.2.2. Atomización electrotérmica

Los atomizadores electrotérmicos, que aparecieron por primera vez en el comercio aproximadamente en 1970, proporcionan generalmente una mayor sensibilidad debido a que toda la muestra se atomiza en un período muy corto y el tiempo promedio de permanencia de los átomos en el camino óptico es de un segundo o más. Los atomizadores electrotérmicos se utilizan para las medidas de absorción atómica, pero por lo general, no se han aplicado para la obtención directa de espectros de emisión. Sin embargo, se están empezando a utilizar

para vaporizar las muestras para la introducción de las mismas en espectroscopia de emisión en plasma de acoplamiento inductivo.

En los atomizadores electrotérmicos, unos pocos microlitros de muestra se evaporan primero a baja temperatura y luego se calcinan a una temperatura algo más alta en un tubo de grafito, similar al de la figura 4.7b, o cubeta de grafito calentado eléctricamente. Tras la calcinación, la corriente se incrementa rápidamente a varios cientos de amperios, lo que eleva la temperatura a unos 2000 o 3000 °C; la atomización de la muestra se produce en un período de tiempo de unos pocos milisegundos a segundos. En estas condiciones, se mide la absorción de las partículas atomizadas en la zona situada inmediatamente por encima de la superficie calentada.

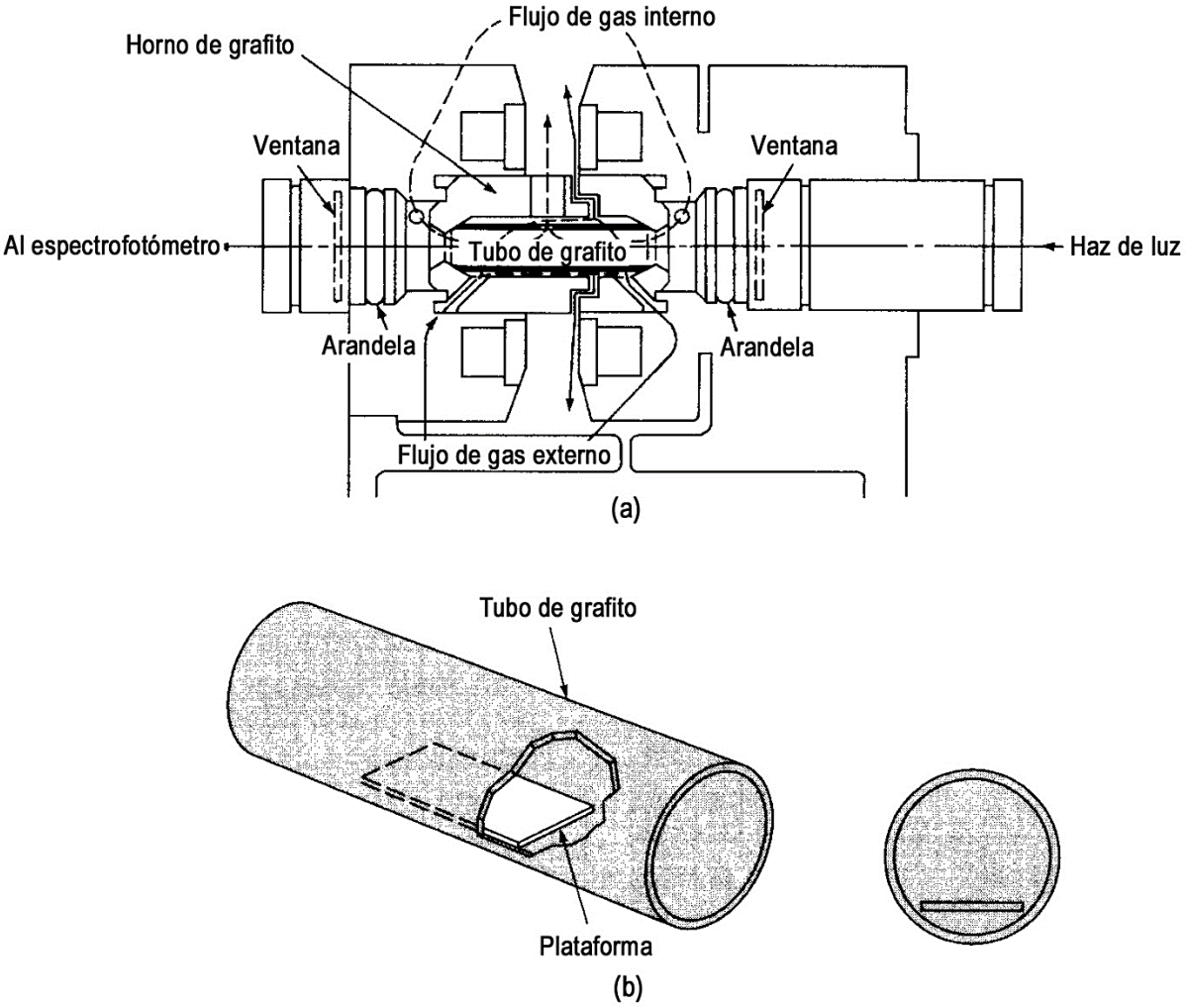


Figura 4.7. (a) Sección transversal de un horno de grafito, (b) Plataforma de L´vov y su posición en el horno de grafito.

Atomizadores electrotérmicos

La figura 4.7a representa una sección transversal de un atomizador electrotérmico comercial. En este sistema, la atomización tiene lugar en un tubo cilíndrico de grafito abierto por ambos extremos y que tiene un orificio central para la introducción de la muestra mediante una micropipeta. El tubo es de unos 5 cm de largo y tiene un diámetro interno de algo menos de 1 cm. El tubo intercambiable de grafito se ajusta perfectamente a un par de contactos eléctricos de grafito cilíndricos que se ubican en los dos extremos del tubo. Estos contactos se mantienen dentro de una caja metálica refrigerada por agua. Existen dos corrientes de gas inerte. La corriente externa previene la entrada de aire exterior y la consiguiente incineración del tubo. La corriente interna fluye por entre los dos extremos del tubo y sale por el orificio central del compartimento de muestra. Esta corriente no sólo elimina el aire, sino que sirve también para desalojar los vapores generados a partir de la matriz de la muestra durante las dos primeras etapas de calentamiento.

La figura 4.7b ilustra la denominada plataforma de L'vov, que se utiliza con frecuencia en los hornos de grafito, como el que se muestra en la figura 4.7a. La plataforma también es de grafito y se encuentra debajo del orificio de entrada de la muestra. La muestra se evapora y se calcina sobre esta plataforma de la manera usual. Sin embargo, cuando la temperatura del tubo se eleva rápidamente la atomización se retrasa, ya que la muestra no está el tiempo suficiente en contacto directo con la pared del horno. Por tanto, la atomización tiene lugar en un medio en el que no se produce un cambio tan rápido de temperatura. De este modo se obtienen picos más reproducibles.

Características de funcionamiento de los atomizadores electrotérmicos

Los atomizadores electrotérmicos ofrecen la ventaja de su elevada sensibilidad para pequeños volúmenes de muestra. En general, se utilizan volúmenes de muestra entre 0,5 y 10 μL; en estas condiciones los límites de detección absolutos se encuentran normalmente en el intervalo de 10^{-10} y 10^{-13} g de analito.

La precisión relativa de los métodos sin llama se encuentra generalmente en el intervalo del 5 al 10 % en comparación con el 1 % o menos que se puede esperar en la atomización con llama o plasma. Además, los métodos de horno son lentos, requiriendo habitualmente varios minutos por elemento. Otra desventaja es que el intervalo analítico es pequeño siendo por lo general menor de dos órdenes de magnitud. Por todo ello, la atomización electrotérmica se aplica normalmente sólo cuando la atomización con llama o plasma proporcionan límites de detección inadecuados.

4.3. FUENTES DE RADIACIÓN

Los métodos analíticos basados en la absorción atómica son potencialmente muy específicos, ya que las líneas de absorción atómica son considerablemente estrechas (de 0,002 a 0,005 nm) y las energías de transición electrónica son únicas para cada elemento. Por otro lado, las limitadas anchuras de línea crean un problema que generalmente no se encuentra en la espectroscopia de absorción molecular. Se sabe que para que exista una relación lineal entre la señal analítica (absorbancia) y la concentración, es decir, que se cumpla la ley de Lambert-Beer, es necesario que la anchura de banda de la fuente sea estrecha respecto a la anchura de un pico de absorción. Sin embargo, incluso los monocromadores de buena calidad tienen anchuras de banda efectivas que son significativamente mayores que la anchura de las líneas de absorción atómica. En consecuencia, al hacer medidas de absorbancia atómica utilizando un espectrofotómetro normal equipado con una fuente de radiación continua, inevitablemente se obtienen curvas de calibrado no lineales. Además, las pendientes de las curvas de calibrado obtenidas con dicho equipo son pequeñas, porque sólo una pequeña fracción de la radiación procedente de la rendija del monocromador es absorbida por la muestra; consecuentemente se obtienen sensibilidades bajas.

El problema creado por la limitada anchura de los picos de absorción atómica se ha resuelto empleando fuentes de líneas con anchura de banda aún más estrechas que los picos de absorción. Por ejemplo, si se elige la línea del sodio de 589,6 nm para el análisis de absorción de este elemento, se utiliza la radiación correspondiente a un pico de emisión del sodio a esta misma longitud de onda.

En este caso, la línea se produce con el empleo una lámpara de vapor de sodio en la que los átomos de sodio se excitan con una descarga eléctrica para inmediatamente después emitir radiación electromagnética correspondiente a la longitud de onda del sodio, la cual es absorbida en la zona de la llama u horno de grafito por los átomos de sodio que forman parte de la nube atómica de la muestra.

Dicho de forma más simple, en espectrometría de absorción atómica se emplean fuentes de radiación construidas del mismo elemento que se desea analizar con vistas a garantizar la emisión de radiación monocromática correspondiente a la longitud de onda de absorción del analito. Para tal propósito se construyen las llamadas lámparas de cátodo hueco.

Lámparas de cátodo hueco

La fuente más común para las medidas de absorción atómica es la lámpara de cátodo hueco, como la que se muestra en la figura 4.8. Ese tipo de lámpara consiste en un ánodo de wolframio y un cátodo cilíndrico cerrados herméticamente en un tubo de vidrio lleno con gas neón o argón a una presión

de 1 a 5 torr. El cátodo está construido con el metal que se desea analizar, o bien, sirve de soporte para una capa de dicho metal.

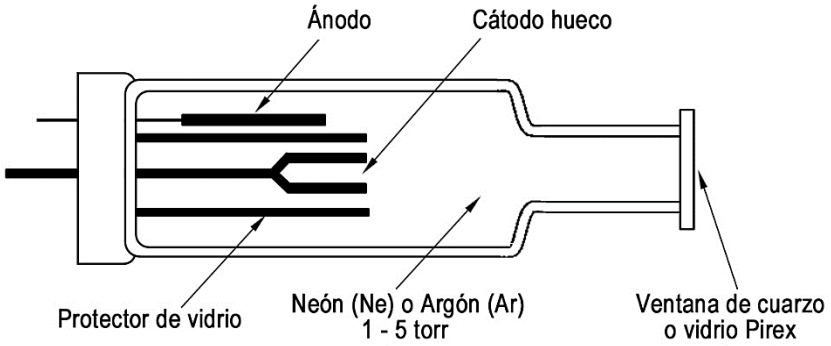


Figura 4.8. Sección transversal de una lámpara de cátodo hueco.

Cuando se aplica un potencial del orden de 300 V entre los electrodos se produce la ionización del gas inerte, lo que da lugar a una corriente de aproximadamente 5 a 15 mA al tiempo que los iones y electrones migran hacia los electrodos. Si el potencial es lo suficientemente grande, los cationes gaseosos adquieren la suficiente energía cinética como para arrancar algunos de los átomos metálicos de la superficie del cátodo y producir una nube atómica: a este proceso se le denomina chisporroteo. Una parte de los átomos metálicos desprendidos se encuentran en estado excitado y de este modo al volver al estado fundamental emiten su radiación característica. Al final, los átomos metálicos se vuelven a depositar difundiendo de nuevo hacia la superficie del cátodo o hacia las paredes de vidrio del tubo.

La configuración cilíndrica del cátodo tiende a concentrar la radiación en una región limitada del tubo metálico: este diseño aumenta también la probabilidad de que la redeposición sea en el cátodo más que sobre las paredes de vidrio.

La eficacia de la lámpara de cátodo hueco depende de su geometría y del potencial aplicado. Los potenciales elevados y, por consiguiente, las corrientes elevadas originan intensidades de radiación mayores. Esta ventaja se neutraliza en parte por el hecho de que las corrientes mayores provocan un aumento del número de átomos no excitados en la nube. Los átomos no excitados, a su vez, son capaces de absorber la radiación emitida por los átomos excitados. Esta auto absorción reduce la intensidad, sobre todo en el centro de la banda de emisión.

En el comercio existe una gran variedad de lámparas de cátodo hueco. En algunos casos los cátodos están constituidos por una mezcla de varios metales, lo que permite el análisis de más de un elemento.

De cualquier modo, un inconveniente de esta técnica de absorción atómica es la necesidad de utilizar una lámpara diferente para el análisis de cada elemento.

Modulación de la fuente

En un instrumento de absorción atómica típico es necesario eliminar las interferencias producidas por la emisión de radiación de la llama. La mayor parte de la radiación que emite la llama se elimina mediante el monocromador. Sin embargo, la radiación emitida correspondiente a la longitud de onda seleccionada por el monocromador está inevitablemente presente en la llama, debido a la excitación y emisión de los átomos del analito. A fin de eliminar los efectos de la emisión en la llama, es necesario modular la salida de la fuente para que su intensidad oscile a una frecuencia constante. De este modo, el detector recibe dos tipos de señal, una alterna, proveniente de la fuente y otra continua que proviene de la llama. Estas señales se convierten en las correspondientes respuestas eléctricas. Para eliminar la señal de corriente continua no modulada y dejar pasar la señal de corriente alterna para su amplificación, se puede utilizar un simple dispositivo electrónico conocido como filtro RC de paso alto cuya descripción y funcionamiento no es objetivo de este texto.

Otra forma sencilla y muy efectiva de modular la emisión de la fuente es interponer en el haz, entre la fuente y la llama, un disco metálico circular, o cortador, al que de forma alterna se le han eliminado cuadrantes para permitir el paso de luz. La rotación del disco a velocidad constante y conocida proporciona un haz intermitente cortado a la frecuencia deseada. Como alternativa, el alimentador de la fuente puede diseñarse para funcionar con corriente alterna o de manera intermitente, para que la fuente se encienda y se apague a una frecuencia constante deseada.

4.4. INTERFERENCIAS EN ESPECTROSCOPIA DE ABSORCIÓN ATÓMICA

En los métodos de absorción atómica se presentan dos tipos de interferencias: las interferencias espectrales y las interferencias químicas. Las interferencias espectrales se producen cuando la absorción o emisión de una especie interferente se solapa o aparece muy próxima a la absorción o emisión del analito, de modo que su resolución por el monocromador resulta imposible. Las interferencias químicas se producen como consecuencia de diversos procesos químicos que ocurren durante la atomización y que alteran las características de absorción del analito.

4.4.1. Interferencias espectrales

Dado que las líneas de emisión de las fuentes de cátodo hueco son muy estrechas, es rara la interferencia debida a la superposición de las líneas. Para que exista esta interferencia, la separación entre las dos líneas tendría que ser menor de aproximadamente 0.1 A.

Por ejemplo, la línea del vanadio a 3082,11 A interfiere en los análisis en que está involucrada la línea de absorción del aluminio a 3082,15 A. Sin embargo, esta interferencia se evita fácilmente utilizando la línea del aluminio a 3092,7 A en lugar de aquélla.

Las interferencias espectrales también se producen debido a la presencia de productos de combustión que poseen bandas de absorción anchas, o de productos en forma de partículas que dispersan la radiación. Ambos disminuyen la potencia del haz transmitido y dan lugar a errores analíticos positivos.

Cuando la procedencia de estos productos es la mezcla de combustible y oxidante se puede realizar fácilmente la corrección midiendo la absorbancia de un blanco pero cuando la absorción o dispersión se debe a la matriz de la muestra, entonces el problema es más complicado.

En este caso, la potencia del haz transmitido, P_t, se reduce por la presencia de los componentes de la matriz, mientras que la potencia del haz incidente. P_0 no resulta afectada; por ello, se produce un error positivo en la absorbancia y por consiguiente, en la concentración. Un ejemplo de una posible interferencia de matriz debida a la absorción, se produce en la determinación de bario en mezclas de elementos alcalinotérreos, como por ejemplo CaOH que actúa como interferencia de absorción. En este caso en particular, se elimina fácilmente la interferencia sustituyendo el aire por óxido nitroso como oxidante, que produce una llama de mayor temperatura capaz de descomponer el CaOH y eliminar su absorción.

La interferencia espectral debida a la dispersión por los productos de la atomización se produce más frecuentemente cuando se aspiran en la llama disoluciones concentradas que contienen elementos tales como Ti, Zr y W, que forman óxidos refractarios. En estos casos se forman partículas de óxidos metálicos, cuyos diámetros son mayores que la longitud de onda de la luz, lo que origina una dispersión del haz incidente. La interferencia debida a la dispersión también puede ser un problema cuando la muestra contiene especies orgánicas o cuando se utilizan disolventes orgánicos para disolver la muestra. En este caso, la combustión incompleta de la matriz orgánica deja panículas carbonosas que son capaces de dispersar la luz.

Afortunadamente, en la atomización con llama, las interferencias espectrales que provienen de los componentes de la matriz no siempre se producen y con frecuencia se pueden evitar modificando los parámetros analíticos, como la temperatura y la relación combustible/oxidante. De una forma alternativa, si se conoce la causa de la interferencia, se puede añadir un exceso de la sustancia interferente tanto a la muestra como a los patrones. Si el exceso añadido a la muestra patrón es grande con respecto a su concentración en la matriz de la muestra, la contribución de esta última será insignificante. La sustancia añadida se denomina a veces amortiguador de radiación.

4.4.2. Interferencias químicas

Las interferencias químicas son más comunes que las espectrales. Frecuentemente sus efectos pueden minimizarse escogiendo las condiciones de trabajo adecuadas.

Existen evidencias teóricas y experimentales que indican que muchos de los procesos que suceden en el seno de la llama están próximos al equilibrio. Consecuentemente, es posible considerar a los gases que se queman como un medio disolvente, al que se puede aplicar cálculos termodinámicos. Los equilibrios de mayor interés son la formación de compuestos de baja volatilidad, las reacciones de disociación y las de ionización.

Formación de compuestos poco volátiles

EI tipo más común de interferencia es probablemente el producido por aniones que forman compuestos de baja volatilidad con el analito y reducen así su velocidad de atomización: lo que origina resultados menores que los esperados. Como ejemplo puede citarse la disminución de la absorbancia del calcio observada a medida que aumenta la concentración de sulfato o fosfato. Así, para una concentración fija de calcio, la absorbancia disminuye de forma casi lineal con el aumento de las concentraciones de sulfato o fosfato hasta que la relación anión/calcio es de aproximadamente 0,5; en estas condiciones la absorbancia es aproximadamente del 30 al 50 % de su valor original y se hace independiente de la concentración del anión.

También se han encontrado ejemplos de interferencias de cationes. Así, el aluminio hace disminuir los resultados en la determinación de magnesio, aparentemente como consecuencia de la formación de un compuesto termoestable de aluminio y magnesio (quizás un óxido).

En muchas ocasiones pueden eliminarse o atenuarse las interferencias debidas a la formación de especies poco volátiles aumentando la temperatura. También se pueden emplear agentes liberadores, que son cationes que reaccionan preferentemente con la interferencia e impiden su interacción con el analito. Por ejemplo, la adición de un exceso de iones estroncio o lantano minimiza la interferencia del fosfato en la determinación del calcio. Estas mismas especies químicas se han utilizado también como agentes liberadores para la determinación del magnesio en presencia de aluminio. En algunos casos el estroncio o el lantano reemplazan al analito en los compuestos que forma con la especie interferente.

Los agentes protectores impiden las interferencias formando con él analito especies estables volátiles. Existen tres reactivos que por lo general se utilizan con este fin, son el EDTA, la 8-hidroxiquinolina y cl APDC (la sal de amonio del ácido l-pirrolidinacarboditioico. Se ha demostrado que la presencia del EDTA elimina las interferencias del aluminio, silicio, fosfato y sulfato en la determinación del calcio. De manera semejante, la 8-hidroxiquinolina elimina la interferencia del aluminio en la determinación del calcio y del magnesio.

Equilibrios de disociación

En el medio gaseoso y caliente de una llama o de un horno, numerosas reacciones de disociación y asociación provocan la conversión de los

constituyentes metálicos a su estado elemental. Parece probable que al menos algunas de estas reacciones sean reversibles y que se les pueda aplicar las leyes de la termodinámica. En consecuencia, debería ser posible formular equilibrios como

$MO = M + O$

$M(OH)_2 = M + 2OH$

donde M representa los átomos del analito.

En la práctica, no se conoce lo suficiente sobre la naturaleza de las reacciones químicas que suceden en la llama como para realizar un tratamiento cuantitativo similar al que se hace en disolución acuosa. En su lugar, debe confiarse en las observaciones empíricas.

Las reacciones de disociación en las que intervienen óxidos e hidróxidos metálicos juegan un papel importante en la determinación de la naturaleza de los espectros de emisión o absorción de un elemento. Por ejemplo, los óxidos de los elementos alcalinotérreos son relativamente estables, con energías de disociación mayores de 5 eV. Las bandas moleculares que se producen por la presencia de óxidos o hidróxidos metálicos en la llama constituyen una característica importante de sus espectros. Excepto a temperaturas muy altas, estas bandas son más intensas que las líneas de los átomos o iones. Por el contrario, los óxidos e hidróxidos de los metales alcalinos se disocian mucho más fácilmente, por lo que las intensidades de las líneas de estos elementos son elevadas. Incluso a temperaturas relativamente bajas.

Por otra parte, parece probable que los equilibrios de disociación en los que intervienen aniones distintos del oxígeno puedan tener también influencia en la absorción y emisión de llama. Por ejemplo, la intensidad de la línea del sodio se reduce notablemente por la presencia de HCl. Una posible explicación es que los átomos de cloro que se forman a partir del HCl añadido disminuyen la concentración de átomos de sodio y por tanto la intensidad de la línea.

Equilibrios de ionización

En las mezclas de combustión que contienen aire como oxidante, la ionización de los átomos y moléculas es pequeña y, por lo general, puede despreciarse. Sin embargo, en las llamas de temperaturas más elevadas en las que el oxidante es el oxígeno o el óxido nitroso, la ionización es más importante, y hay una concentración notable de electrones libres como consecuencia del equilibrio

$M = M^+ + e^-$

donde M representa a un átomo o molécula neutros y M^+ a su ion.

La presencia de tales equilibrios entre iones y átomos en las llamas tiene algunas consecuencias importantes en la espectroscopia de llama, Por ejemplo, la intensidad de las líneas de absorción o emisión atómicas de los metales alcalinos,

en particular del potasio, rubidio y cesio, está afectada de forma compleja por la temperatura. Las temperaturas elevadas provocan un aumento de la población de átomos excitados, sin embargo, contrarrestando este efecto, hay una disminución de la concentración de átomos como resultado de la ionización. Por tanto, en determinadas circunstancias, en las llamas más caloríficas se puede observar una disminución de la absorción o emisión. Por esta razón, suelen utilizarse temperaturas de excitación más bajas para el análisis de los metales alcalinos.

Los efectos de los desplazamientos de los equilibrios de ionización con frecuencia se pueden eliminar con la adición de un supresor de ionización, el cual proporciona una concentración relativamente alta de electrones en la llama y como consecuencia se suprime la ionización del analito.

4.5. TÉCNICAS ANALÍTICAS DE ABSORCIÓN ATÓMICA

4.5.1. Preparación de la muestra

Una desventaja de los métodos espectroscópicos de llama es el requisito de que la muestra se ha de introducir en disolución, por lo general acuosa. Desafortunadamente, muchos materiales de interés, tales como suelos, tejidos animales, plantas, derivados del petróleo y minerales, no son directamente solubles en los disolventes habituales, y con frecuencia requieren un tratamiento previo laborioso para obtener una disolución del analito adecuada para la atomización. De hecho, las etapas de descomposición y disolución a menudo consumen más tiempo e introducen más errores que la propia medida espectroscópica.

La descomposición de materiales como los citados requiere por lo general tratamientos drásticos de la muestra a altas temperaturas con la consiguiente pérdida potencial de analito por volatilización o en forma de aerosoles en el humo. Además, los reactivos utilizados en la descomposición de la muestra, con frecuencia introducen los tipos de interferentes químicos y espectrales que se han discutido anteriormente, y por otra parte el analito puede estar presente en estos reactivos como una impureza. De hecho, si no se tiene mucho cuidado, no es extraño encontrar en el análisis de trazas que los reactivos introduzcan más elementos de interés que las propias muestras, una situación que puede conducir a serios errores incluso con correcciones del blanco.

De cualquier manera, en general el objetivo central de la etapa de preparación de la muestra es la eliminación del material orgánico, con vistas a que el mismo no interfiera en el complejo proceso de formación de átomos neutros en la llama o en el horno.

Los métodos que con mayor frecuencia se emplean en el proceso de preparación de la muestra son los siguientes:

Descomposición seca: Consiste en la descomposición de la muestra por incineración en mufla a altas temperaturas (500 – 550 ºC) y posterior disolución de las cenizas obtenidas en ácidos fuertes.

Digestión húmeda: Consiste en el tratamiento de la muestra con ácidos minerales en caliente, generalmente ácido sulfúrico, nítrico o perclórico, los cuales oxidan la materia orgánica resultando una disolución contentiva del material inorgánico.

Digestión por interacción con microondas: La muestra es mezclada con ácidos minerales u oxidantes fuertes y se introduce en un horno de microondas. La energía de la radiación de microondas interactúa con la muestra y ocurre digestión de la materia orgánica.

Sonicación: La muestra mezclada con ácidos fuertes se coloca en un baño de ultrasonido. Hay formación de OH* y de H_2O_2 ocurriendo digestión de la materia orgánica.

Debe señalarse que en algunas ocasiones se realiza la atomización directa de la muestra sin previo tratamiento como es el caso de la determinación de cobre en cerveza, determinación de cobre y zinc en vinagres, determinación de hierro y aluminio en aguas, entre otros. De modo general puede prescindirse de la etapa de preparación de la muestra cuando se analizan matrices de bajo contenido de materia orgánica, siempre y cuando se tenga garantía de la no existencia de interferencias en la llama.

Una de las ventajas de la atomización electrotérmica es que algunos materiales pueden atomizarse directamente evitando de esta manera la etapa de disolución. Por ejemplo, las muestras líquidas como sangre, derivados del petróleo y disolventes orgánicos pueden pipetearse y transferirse directamente al homo para su calcinación y atomización. Las muestras sólidas, como hojas de plantas, tejidos animales o algunas sustancias inorgánicas, pueden pesarse directamente en atomizadores tipo cubeta o en navecillas de tántalo para su introducción en hornos tipo tubo. Sin embargo, por regla general, la calibración es difícil y requiere de patrones que se aproximen a la composición de la muestra.

4.5.2. Análisis Cualitativo

La aplicación de la espectrometría de absorción atómica (EAA) en la identificación de elementos metálicos se encuentra limitada por la necesidad instrumental de utilizar una lámpara de cátodo hueco construida del mismo metal que se analiza. Este hecho imposibilita la identificación de varios elementos simultáneamente en una misma muestra, por cuanto resulta obligado cambiar la lámpara cada vez que se analice un elemento en particular.

No obstante, la EAA puede utilizarse como método corroborativo si se desea conocer la presencia de unos pocos metales en particular, siempre y cuando se posean las lámparas adecuadas.

4.5.3. Análisis Cuantitativo

Las aplicaciones fundamentales de la EAA se encuentran precisamente en el análisis cuantitativo. Los métodos más empleados para estos fines son las curvas de calibración (ver epígrafe 3.7.2.2), el método del patrón externo (ver epígrafe 3.7.2.1) y el método de adición de patrón.

Curvas de calibración y patrón externo

En teoría, la absorción atómica debería cumplir la ley de Lambert Beer, siendo la absorbancia directamente proporcional a la concentración. Sin embargo, se encuentran con frecuencia desviaciones de la linealidad, y es arriesgado realizar un análisis por absorción atómica sin determinar experimentalmente si existe o no una relación lineal. Por consiguiente, se debería preparar periódicamente una curva de calibrado que cubra el intervalo de concentraciones correspondiente a la muestra. Además, en la atomización y en la medida de la absorbancia existen un gran número de variables incontrolables que justifican la medida de una disolución patrón cada vez que se realiza un análisis. Es por ello que el método del **patrón externo** solo se emplea cuando se tiene la certeza del cumplimiento de la ley de Lambert Beer.

Método de la adición de patrón

El método de la adición de patrón, se utiliza ampliamente en espectroscopia de absorción atómica con objeto de contrarrestar parcialmente o por completo las interferencias químicas y espectrales introducidas por la matriz de la muestra.

El método de la adición patrón es especialmente útil para analizar muestras complejas en las que la probabilidad de que se produzcan efectos debidos a la matriz es considerable.

En este método varias alícuotas idénticas Vx de la disolución de muestra problema con una concentración c_x desconocida, se transfieren a matraces aforados de volumen Vt. A cada uno de ellos, se le añade un volumen variable y creciente (Vp) de una disolución patrón de referencia del analito que tiene una concentración exactamente conocida y luego se enrasan los matraces hasta el aforo. De esta forma se obtienen diferentes soluciones que contienen la misma cantidad de muestra y concentraciones crecientes y exactamente conocidas del patrón de referencia del analito. Debe señalarse que a una de las réplicas de la solución de muestra problema no se le añade patrón de referencia. Con posterioridad se atomizan en el equipo cada una de las disoluciones por separado y se obtienen las señales de absorbancia correspondientes. La figura 4.9 ilustra este procedimiento.

Una vez realizadas las lecturas de absorbancia se obtiene un juego de datos de concentración de los patrones de referencia (PR) del analito vs. sus respectivos valores de absorbancia (tabla 4.2). Obviamente el valor más pequeño de absorbancia se corresponderá con la disolución de muestra problema a la cual no se ha adicionado patrón de referencia y a partir de este valor, las restantes

lecturas irán incrementándose en la medida en que se incrementa la cantidad de patrón de referencia añadido.

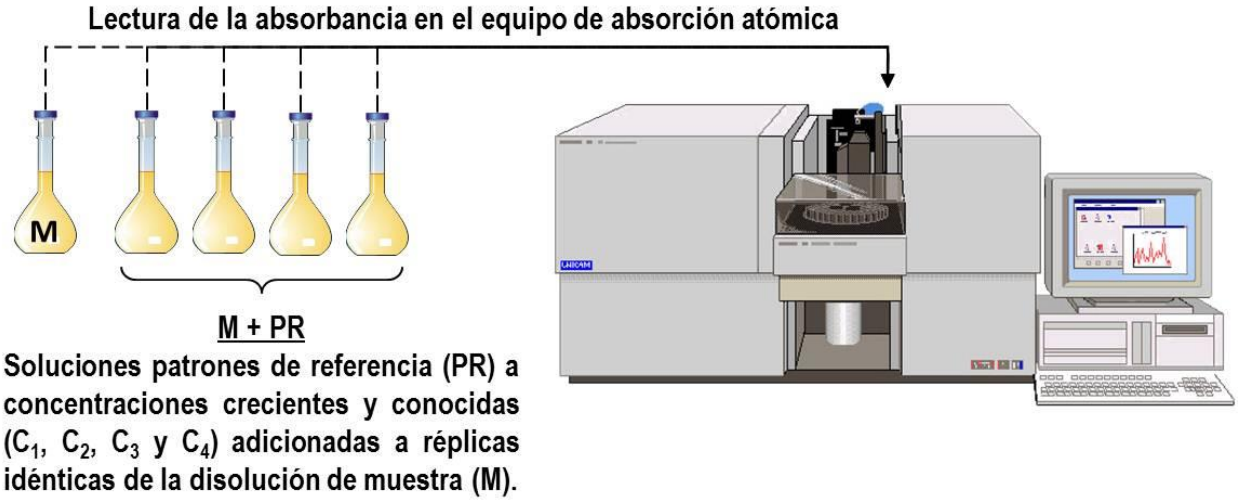


Figura 4.9. Procedimiento de preparación y lectura de una curva de adición de patrón.

Tabla 4.2. Juego de datos obtenidos una vez determinada la señal de cada disolución.

Concentración de PR	Absorbancia
0	$A_m^{(1)}$
C_1	A_1
C_2	A_2
C_3	A_3
C_4	A_4

$A_m^{(1)}$: *Absorbancia de la disolución de muestra problema sin adición de patrón de referencia*

Los resultados experimentales obtenidos se procesan mediante regresión lineal simple con ayuda del método de los mínimos cuadrados para obtener la ecuación de regresión ***y = mx + a***

Resulta evidente que en el caso de una curva de adición de patrón el intercepto de la recta de regresión (***a***) no parte de cero, por cuanto el primer punto de la curva correspondiente a cero concentraciones del patrón (y, por lo tanto, el valor del intercepto (***a***) es precisamente el valor de absorbancia de la disolución de muestra problema A_m sin adición de patrón de referencia (tabla 4.2 y figura 4.10a)

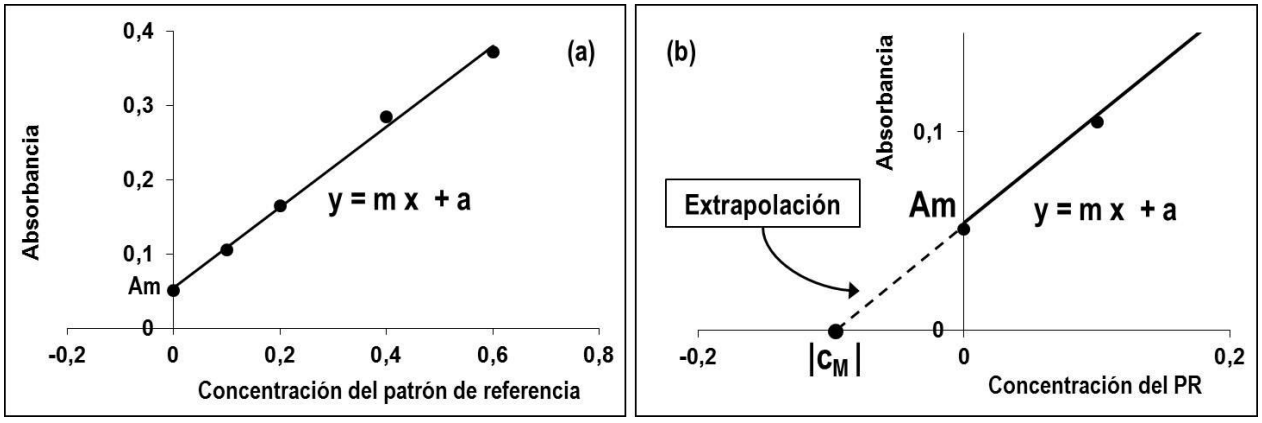


Figura 4.10. (a) Comportamiento gráfico de una curva de adición de patrón, (b) Extrapolación de la curva hacia la zona negativa del eje x para el cálculo de la concentración de la disolución de muestra problema c_M.

Para el cálculo de la concentración de la disolución de la muestra problema c_M a partir del gráfico de regresión, se extrapola la recta hacia el eje "x" y el módulo del valor resultante $|c_M|$ cuando la recta toque el eje negativo "x" es la concentración de la disolución de muestra problema (figura 4.10b).

Obviamente, en la práctica no se emplea este método gráfico sino que se hace uso de la ecuación de regresión obtenida. La figura 4.10b muestra que al valor del módulo de la concentración de la muestra $|c_M|$ obtenida por extrapolación le corresponde un valor de absorbancia igual cero. De ahí que al emplear la ecuación de regresión se sustituye "y" por el valor cero y despejando se calcula la concentración de la muestra problema, es decir:

$$y = mx + a$$

donde: ***y****= 0*

m *es la pendiente*

a *es el intercepto, cuyo valor debe ser muy cercano a la absorbancia de la muestra*

x *es la concentración de la muestra (su valor modular)*

despejando entonces quedaría:

$$x = \left|\frac{0 - a}{m}\right|$$

Para comprobar el ajuste del modelo de regresión a los datos experimentalmente obtenidos, con vistas a conocer la confiabilidad de los resultados obtenidos de la ecuación de regresión se realizan las pruebas estadísticas explicadas en el epígrafe 3.7.2.2, las cuales son válidas para el caso de una curva de calibración y de una curva de adición de patrón.

Un resumen de estas pruebas, así como su interpretación práctica para estos métodos ce cuantificación se relaciona en la tabla 4.3.

Tabla 4.3.

Parámetros estadísticos a considerar para verificar el ajuste del modelo a los resultados experimentales en una curva de calibración y en una curva de adición de patrón.

Parámetros estadísticos	Resultados que expresan el ajuste del modelo	Significado práctico de los parámetros estadísticos calculados
Coeficiente de determinación (R^2)	Cercano al valor 1 En la práctica científica se plantea que para métodos espectrofotométricos R^2 debe ser ≥ 0,99	**Curva de calibración y Adición de patrón:** Expresa linealidad. Indica la proporción entre el error explicado por la regresión con respecto al error total.
Anova simple de la regresión	Significativo	**Curva de calibración y Adición de patrón:** Expresa linealidad. Indica la proporción entre el error explicado por la regresión con respecto al error no explicado.
Prueba de hipótesis para la pendiente	Pendiente significativa	**Curva de calibración y Adición de patrón:** Expresa la variación significativa de la señal analítica (Absorbancia, Transmitancia, Fluorescencia, etc.) con el incremento de la concentración de los patrones de referencia.
Prueba de hipótesis para el intercepto	Intercepto no significativo	**Curva de calibración:** La significación se calcula con respecto a cero. Expresa que la recta parte del origen, es decir, que el intercepto es estadísticamente igual a cero. **Adición de patrón:** La significación se calcula con respecto al valor de absorbancia de la muestra (Am). Expresa que la recta parte del valor de Am, es decir, que el intercepto es estadísticamente igual a Am.

4.6. APLICACIONES DE LA ESPECTROMETRÍA DE ABSORCIÓN ATÓMICA

La espectrometría de absorción atómica constituye un medio sensible para la determinación cuantitativa de más de 60 elementos metálicos o metaloides. Las líneas de resonancia de los elementos no metálicos se localizan en general por debajo de los 200 nm y sólo es posible su determinación con espectrofotómetros que operan al vacío.

Límites de detección

En la tabla 4.4 se indican los límites de detección por absorción atómica de llama y electrotérmica para algunos de los elementos más comunes.

Para muchos elementos, los límites de detección en espectroscopia de absorción atómica de atomización con llama se encuentran en el intervalo de 1 a 20 ng/mL o 0.001 a 0.020 ppm; con atomización electrotérmica los valores correspondientes son 0.002 a 0.01 ng/mL o 2 x 10^{-6} a 1 x 10^{-5} ppm En algunos casos se hallan límites de detección muy alejados de estos intervalos.

Tabla 4.4.

Límites de detección para algunos elementos en atomización por llama y atomización electrotérmica.

Elemento	Límite de detección (ng/mL)	
	EAA por llama	EAA electrotérmica
Aluminio	30	0,005
Arsénico	100	0,02
Calcio	1	0,02
Cadmio	1	0,0001
Cromo	3	0,01
Cobre	2	0,002
Hierro	5	0,005
Mercurio	500	0,1
Magnesio	0,1	0,00002
Manganeso	2	0,0002
Molibdeno	30	0,005
Sodio	2	0,0002
Níquel	5	0,02
Plomo	10	0,002
Estaño	20	0,1
Vanadio	20	0,1
Zinc	2	0,00005

Exactitud

En condiciones normales, el error relativo asociado con el análisis de absorción con llama es del orden del 1 al 2 %. Cuando se toman precauciones especiales esta cifra se puede reducir a unas pocas décimas por cien. Por lo general, los errores que se obtienen con la atomización electrotérmica son de 5 a 10 veces mayores que los de la atomización con llama.

4.6.1. Aplicaciones en el análisis de los alimentos

La espectrometría de absorción atómica presenta múltiples aplicaciones en la determinación de un gran número de elementos minerales en los alimentos constituyendo una poderosa herramienta para el análisis cuantitativo.

La cuantificación de minerales en los alimentos reviste gran importancia debido a que estos micronutrientes desempeñan importantes funciones nutricionales y por otra parte otros pueden resultar tóxicos a determinadas concentraciones.

Así por ejemplo, metales como el calcio (Ca), magnesio (Mg), hierro (Fe), fósforo (P), cobalto (Co), cromo (Cr), silicio (Si) y vanadio (V) son inocuos a las concentraciones habituales en que se encuentran en los alimentos, sin embargo el sodio (Na), potasio (K), flúor (F), cobre (Cu), zinc (Zn), manganeso (Mn), molibdeno (Mb), níquel (Ni), selenio (Se), litio (Li) y germanio (Ge), si bien son inocuos a bajas concentraciones, un exceso de los mismos debido a fenómenos de contaminación pueden ser perjudiciales para la salud.

Un grupo particularmente importante es aquel que incluye metales tóxicos aun en muy bajas concentraciones por lo es necesario realizar un estricto control de su presencia en los alimentos. Tal es el caso del mercurio (Hg), plomo (Pb), cadmio (Cd), estaño (Sn), tantalio (Ta) y arsénico (As), entre otros.

La presencia de minerales en los alimentos puede deberse a múltiples factores, entre los que pueden citarse:

- *La composición natural de los alimentos naturales y elaborados*: En los primeros, el contenido de minerales está influenciado por la variedad, la especie, la alimentación animal y la composición de los suelos de cultivo, entre otros factores. En el caso de los alimentos elaborados el aporte mineral de los ingredientes utilizados en las formulaciones es el factor más importante.
- *La contaminación no deseada de productos naturales y elaborados*: En este caso la contaminación ambiental y las malas prácticas agroquímicas son la principal fuente de contaminación de los alimentos naturales, en tanto la contaminación durante los procesos de elaboración y el tránsito de los metales del envase a los productos constituyen las vías más usuales de adulteración de los productos elaborados.

En la tabla 4.5, se relacionan algunas aplicaciones de la espectrometría de absorción atómica (EAA) en el análisis de alimentos

Tabla 4.5. Algunas aplicaciones de la EAA en el análisis de alimentos.

Elemento	Alimento	Preparación de la muestra	Sistema de atomización	$\lambda_{trabajo}$
Aluminio	Aguas	Aspiración directa	Horno de grafito	309,3 nm
Hierro	Aguas	Aspiración directa	Horno de grafito	248,3 nm
	Vinos	Descomposición seca	Llama	
	Lácteos	Descomposición seca	Llama	
	Cárnicos	Descomposición seca	Llama	
Manganeso	Aguas	Aspiración directa	Horno de grafito	279,5 nm
Cobre	Aguas	Aspiración directa	Llama Aire-Acetileno	324,7 nm
	Cereales	Descomposición seca	Llama Aire-Acetileno	

Elemento	Alimento	Preparación de la muestra	Sistema de atomización	$\lambda_{trabajo}$
	Cervezas	Aspiración directa	Llama Aire-Acetileno	
	Vinos	Descomposición seca	Llama Aire-Acetileno	
	Rones	Descomposición seca	Llama Aire-Acetileno	
Zinc	Aguas	Aspiración directa	Llama Aire-Acetileno	213,8 nm
	Cervezas	Aspiración directa	Llama Aire-Acetileno	
	Vinos	Descomposición seca	Llama Aire-Acetileno	
	Vinagres	Aspiración directa	Llama Aire-Acetileno	
	Rones	Descomposición seca	Llama Aire-Acetileno	
Plomo	Cereales	Descomposición seca	Llama Aire-Acetileno	283 nm
	Vinos	Descomposición seca	Llama Aire-Acetileno	
	Rones	Descomposición seca	Llama Aire-Acetileno	
	Cárnicos	Descomposición seca	Llama Aire-Acetileno	
Estaño	Vinos	Digestión húmeda	Llama óxido nitroso-acetileno	286 nm
	Cárnicos	Digestión húmeda	Llama óxido nitroso-acetileno	
Cadmio	Arroz	Digestión húmeda	Llama Aire-Acetileno	228,8 nm

Trabajo Independiente

1. *Consulte los apéndices B-1, B-3, B-4, B-5 y B-6, en los que aparece un resumen del presente capítulo. Céntrese en la comparación de los métodos de absorción molecular y absorción atómica.*
2. *Resuelva los ejercicios 4 y 5 que aparecen en el **Capítulo 14 / epígrafe 14.1. Ejercicios propuestos**, así como el ejercicio 9 del mismo epígrafe, centrándose en este último caso en el análisis de la técnica 3 (Determinación de cobre en pastas alimenticias).*
3. *Resuelva el ejercicio 2 que aparece en el Capítulo **14 / epígrafe 14.3. Análisis de documentación científica**.*

BIBLIOGRAFÍA

1. Analíticos en Alimentaria. Métodos Oficiales de Análisis. Aguas potables de consumo público y aguas de bebidas envasadas. Ed. Panreac Química SA, 1999.

2. Analíticos en Alimentaria. Métodos Oficiales de Análisis. Carne y productos cárnicos. Ed. Panreac Química SA, 1999
3. Analíticos en Alimentaria. Métodos Oficiales de Análisis. Cereales, derivados de cereales y cerveza. Ed. Panreac Química SA, 1999
4. Analíticos en Alimentaria. Métodos Oficiales de Análisis. Productos derivados de la uva, aguardientes y sidra. Ed. Panreac Química SA, 1999.
5. Bermejo, R; Moreno, A. (2014). Análisis Instrumental. Editorial Síntesis S. A. Madrid.
6. Cano, B. (2018). Guía de laboratorio de Análisis Instrumental. Corporación Universitaria Rafael Núñez.
7. Fernández, L; Rojas, L; Lapo, B. (2015). Desarrollos experimentales en Análisis Instrumental. Ediciones UTMACH.
8. McLeod, J. A. (1973). Instrumental Methods of Food Analysis. Elek Science. London.
9. Polo, J. C. (2009). Regresión lineal simple. Comunicación personal. Instituto de Farmacia y Alimentos. Universidad de La Habana. Cuba.
10. Rubinson, K & Rubinson, J. (2001). Análisis Instrumental. Pearson Educación SA. Madrid.
11. Sayago, A; Hernanz, D; Gallo, V; Beltrán, R. (2011). Adaptación de las prácticas de Análisis Instrumental al Espacio de Convergencia Europeo. Elaboración de Material Didáctico. Formación Universitaria – Vol. 4 Nº 1.
12. Sierra, M; Gómez, S; Morante, S; Pérez, D; Sanchez, A; Gañan, J. (2015). Análisis Instrumental. Experiencia de Innovación Docente en la URJC. Ed. Dykinson. Madrid.
13. Skoog, D; Holler, F y Nieman, T. (2001). Principios de Análisis Instrumental. Quinta edición. McGraw-Hill/Interamericana de España, S.A.U.
14. Skoog, D; Holler, J; Crouch, S. (2008). Principios de análisis instrumental. 6ta ed. Cengage Learning Editores.

5 Espectrometría de emisión atómica

5.1. PRINCIPIOS GENERALES DE LA ESPECTROMETRÍA DE EMISIÓN ATÓMICA

La espectroscopia de emisión atómica (también llamada EEA) es un método instrumental de la Química Analítica que determina una gran variedad de elementos metálicos, siendo capaz de detectar y determinar cuantitativamente la mayoría de los elementos del sistema periódico. Sus campos de aplicación son, por tanto, muy diversos. Se emplea en el análisis de aguas, análisis de suelos, bioquímica, toxicología, medicina, industria farmacéutica, industria alimentaria, industria petroquímica, etc.

En este caso la concentración del analito se determina a partir de las medidas de potencia emitida (P_E) por los átomos libres de un elemento en particular, a la longitud de onda de emisión específica de este elemento. La conversión del analito en átomos neutros se logra cuando la muestra es calentada en una llama, un plasma, una chispa o un arco eléctrico (tabla 5.1).

Tabla 5.1. Tipos de atomizadores utilizados en espectroscopia de emisión atómica

Tipo de atomizador	Métodos de atomización	Temperatura de atomización característica (ºC)
Llama	Aspiración de la solución de la muestra dentro de una llama.	1700 - 3150
Plasma de Argón de acoplamiento inductivo (ICP)	Muestra calentada en un plasma de argón.	4000 - 6000
Plasma de Argón de corriente continua (DCP)		
Arco eléctrico	Muestra calentada en un arco eléctrico.	4000 - 5000
Chispa eléctrica	Muestra excitada en una chispa de alto voltaje.	4000

A diferencia de la espectrometría de absorción atómica, en los métodos de emisión atómica los atomizadores citados en la tabla 5.1 no sólo transforman los componentes de las muestras en átomos o iones elementales sencillos, sino que también, durante el proceso, excitan una parte de estas especies a estados electrónicos superiores. La rápida relajación de las especies excitadas y su regreso al estado fundamental va acompañada de la emisión de radiación electromagnética y la producción de espectros de líneas ultravioleta y visible que son útiles para el análisis cualitativo y cuantitativo de los elementos.

En resumen, la espectrometría de emisión atómica se basa en la *emisión de energía radiante de las zonas del UV o el Visible por átomos libres o neutros en estado gaseoso, del elemento que se analiza, los cuales han sido previamente excitados por energía térmica.*

A fin de explicar los principios generales de la emisión atómica, partamos de los componentes fundamentales de un equipo de emisión atómica y de los procesos fundamentales que ocurren en el mismo.

Los instrumentos para espectrometría de emisión atómica (EEA) constan de manera general de un *sistema de atomización de la muestra*, consistente en una llama, un plasma de argón, un arco o una chispa eléctrica, un *selector de longitud de onda*, un *detector* y un *procesador de la señal y de la lectura de salida*.

La *muestra*, convenientemente preparada y generalmente en disolución, es introducida en el *sistema de atomización* en el cual, por acción de las altas temperaturas, se vaporiza el disolvente, se disocian las moléculas y se convierten en átomos libres correspondientes a todos los elementos presentes inicialmente en ella.

Como ya se ha mencionado, en espectrometría de emisión atómica no se requiere de una fuente de radiación externa sino que el sistema de atomización es a la vez la fuente de excitación. Así, los átomos en estado de vapor se excitan por la energía térmica producida por la llama, el plasma, el arco o la chispa y al desexcitarse, emiten radiación electromagnética de potencia P_E a una longitud de onda característica.

La potencia emitida P_E llega a un *selector de longitud de onda* en el que se ha seleccionado la longitud de onda correspondiente a la línea de emisión del elemento que se desea determinar. La función de este dispositivo es eliminar las interferencias producidas por la emisión del resto de los elementos presentes en la muestra que se encuentran excitados en el sistema de atomización, dejando pasar únicamente la línea de emisión correspondiente a la longitud de onda del analito.

A continuación del *selector de longitud de onda* se coloca un *detector*, generalmente un tubo fotomultiplicador, capaz de transformar, en relación proporcional, las señales de potencia de radiación electromagnética emitida en señales eléctricas o de intensidad de corriente, las cuales llegan al *procesador de señal*, que es por lo general un dispositivo electrónico que amplifica la señal eléctrica generada por el *detector* y registra el valor de potencia emitida P_E. De forma análoga a lo explicado para los procesadores de señales en absorción molecular y atómica, en la actualidad el registro de la señal de P_E se acopla a sistemas computarizados que con ayuda de potentes software almacenan la información y realizan cálculos cuantitativos entre otras funciones.

La figura 5.1 muestra un esquema general del equipo y de los procesos fundamentales que ocurren en el mismo.

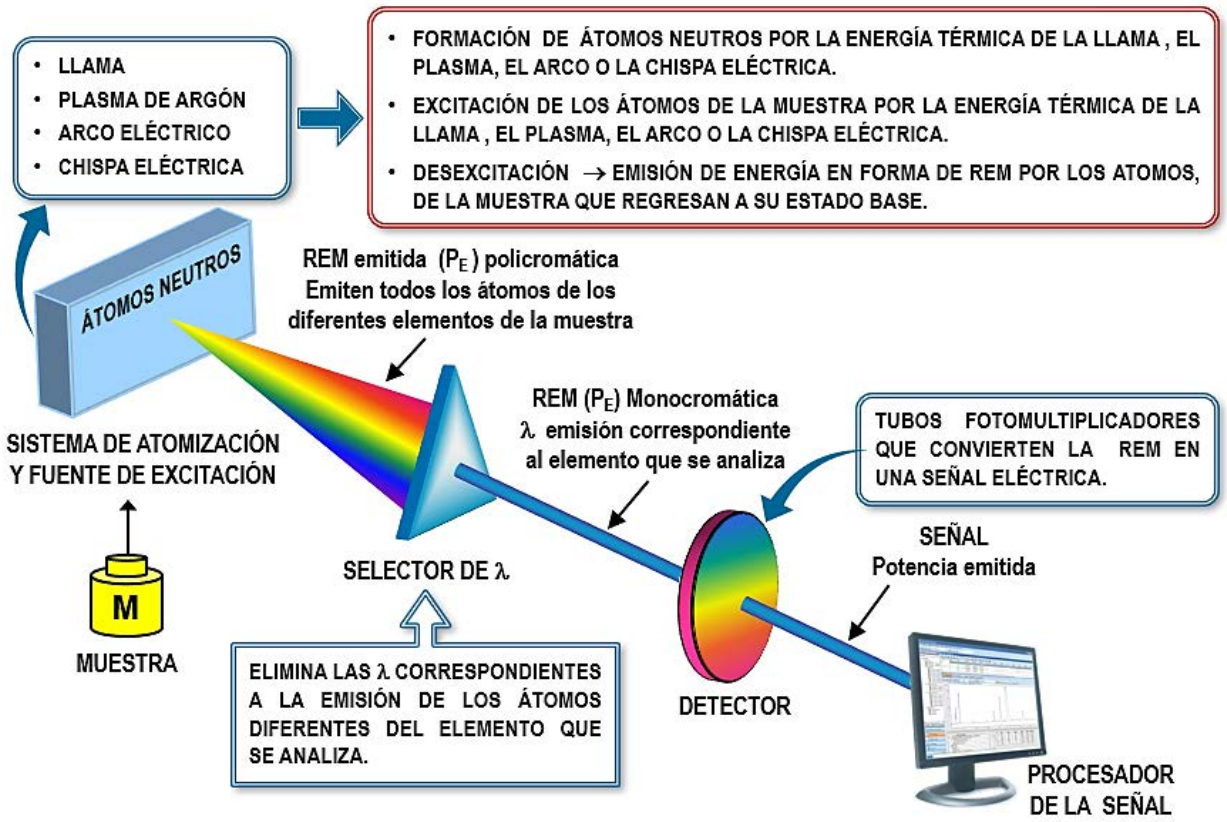


Figura 5.1. Componentes básicos y procesos en un espectrómetro de emisión atómica

Históricamente, la espectroscopia de emisión atómica requería la atomización y excitación mediante llama, arco eléctrico y chispa eléctrica. Estos métodos todavía tienen aplicaciones importantes para el análisis de elementos metálicos. Sin embargo, actualmente las fuentes de plasma se han convertido en las más importantes y más ampliamente utilizadas en espectrometría de emisión atómica, en especial las fuentes de plasma de acoplamiento inductivo.

La espectrometría de emisión de plasma, arco y chispa ofrece varias ventajas con respecto a los métodos de absorción de llama y electrotérmico considerados en el capítulo 4. Entre sus ventajas está la menor interferencia entre elementos, que es una consecuencia directa de sus temperaturas más elevadas. En segundo lugar, se obtienen buenos espectros de emisión para la mayoría de los elementos en unas mismas condiciones de excitación; en consecuencia, se pueden registrar simultáneamente espectros para docenas de elementos. Esta propiedad tiene especial importancia en el análisis cualitativo multielemental de muestras muy pequeñas. Desde este punto de vista, las fuentes de llama son menos satisfactorias, porque las condiciones óptimas de excitación varían mucho de un elemento a otro; se necesitan altas temperaturas para la excitación de algunos

elementos y bajas para otros; por último, la región de la llama que permite obtener intensidades óptimas de la línea analítica es distinta de un elemento a otro. Otra ventaja de las fuentes de plasma, más energéticas, es que permiten la determinación de bajas concentraciones de elementos que tienden a formar compuestos refractarios (es decir, compuestos que son muy resistentes a la descomposición térmica, tales como óxidos de boro, fósforo. wolframio. uranio, circonio y niobio). Además, las fuentes de plasma permiten la determinación de no metales como cloro, bromo, yodo y azufre. Finalmente, los métodos con fuentes de plasma tienen generalmente unos intervalos lineales de concentración que abarcan varias decenas de órdenes de magnitud, a diferencia de los métodos de absorción descritos en el capítulo anterior que sólo abarcan dos o tres órdenes.

Los espectros de emisión obtenidos utilizando fuentes de plasma, arco o chispa con frecuencia son más complejos, están constituidos por cientos, e incluso miles de líneas. Esta cantidad de líneas, que es muy ventajosa cuando se busca información cualitativa, aumenta la probabilidad de interferencias espectrales en el análisis cuantitativo. Consecuentemente, la espectroscopia de plasma, arco y chispa requiere equipos ópticos de mayor resolución y más caros que los de absorción atómica de llama o electrotérmica.

A pesar de sus diversas ventajas, es poco probable que los métodos de emisión que utilizan fuentes de alta energía desplacen por completo alguna vez a los procedimientos de absorción atómica de llama y electrotérmicos. De hecho, los métodos de absorción y emisión atómicos resultan ser complementarios. Entre las ventajas de los procedimientos de absorción atómica se encuentran las de requerir equipos más simples y menos caros, menores costos de operación, una precisión algo mayor (al menos hasta el momento), y que para obtener resultados satisfactorios no se necesita una gran habilidad por parte del operador.

Teniendo en cuenta la importancia que revisten las diferentes fuentes de excitación se profundizará a continuación en las características generales de cada una de ellas.

5.2. ESPECTROSCOPIA DE EMISIÓN CON FUENTES DE PLASMA

Por definición un plasma es una mezcla gaseosa conductora de la electricidad que contiene una concentración significativa de cationes y electrones (la concentración de ambos es tal que la carga neta se aproxima a cero). En el plasma de argón empleado frecuentemente en los análisis de emisión, los iones de argón y los electrones son las principales especies conductoras, aunque los cationes de La muestra también estén presentes en menor cantidad. Una vez que se han formado los iones de argón en un plasma, son capaces de absorber la suficiente energía de una fuente externa como para mantener la temperatura a

un nivel tal que la posterior ionización sustente el plasma indefinidamente; así, la temperatura puede llegar a ser de 10000 K.

Existen dos tipos de plasma de alta temperatura: el plasma de acoplamiento inductivo (ICP) y el plasma de corriente continua (DCP), los cuales serán tratados con detalle a continuación.

5.2.1. La fuente de plasma de acoplamiento inductivo

La figura 5.2 muestra un esquema de una fuente típica de plasma de acoplamiento inductivo denominada antorcha. Consiste en tres tubos concéntricos de cuarzo a través de los cuales fluyen corrientes de argón. Dependiendo del diseño de la antorcha, la velocidad de consumo total de argón es de 5 a 20 L/min. El diámetro del tubo más grande es de aproximadamente 2.5 cm. Rodeando la parte superior de este tubo se encuentra una bobina de inducción refrigerada por agua, que está alimentada por un generador de radiofrecuencia capaz de producir una potencia de 0.5 a 2 kW a unos 27 ó 41 MHz. La ionización del argón que fluye se inicia por medio de una chispa que proviene de una bobina Tesla. Los iones resultantes y sus electrones asociados interaccionan entonces con el campo magnético oscilante (indicado como H en la figura 5.2) producido por la bobina de inducción. Esta interacción hace que los iones y los electrones dentro de la bobina se muevan en trayectorias circulares, representadas en la figura 5.2; el calentamiento óhmico es consecuencia de la resistencia que presentan los iones y electrones a este movimiento.

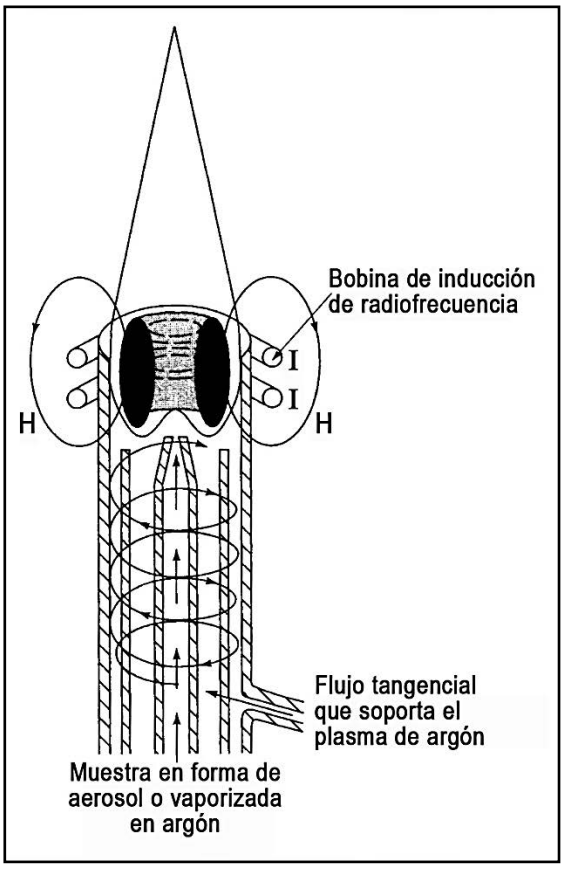


Figura 5.2. Típica fuente de plasma de acoplamiento inductivo

La temperatura del plasma así formado es lo suficientemente elevada como para hacer necesario el aislamiento térmico del cilindro exterior de cuarzo. Para lograrlo, se hace fluir argón de forma tangencial alrededor de las paredes del tubo, como indican las flechas en la figura 5.2; este flujo enfría las paredes interiores del tubo central y centra el plasma radialmente.

Hay que considerar que el caudal de argón a través de una antorcha típica es lo suficientemente elevado y supone un costo significativo (varios miles de dólares al año).

Introducción de la muestra

Las muestras se introducen dentro de la antorcha mostrada en la figura 5.2 mediante un flujo de argón de 0,3 a 1,5 L/min a través del tubo central de cuarzo. Las muestras se introducen en el flujo de argón generalmente en forma de disoluciones y menos frecuentemente como una suspensión de un polvo finamente dividido en un líquido. Con frecuencia, la mayor fuente de ruido en un método de ICP radica en la etapa de introducción de la muestra.

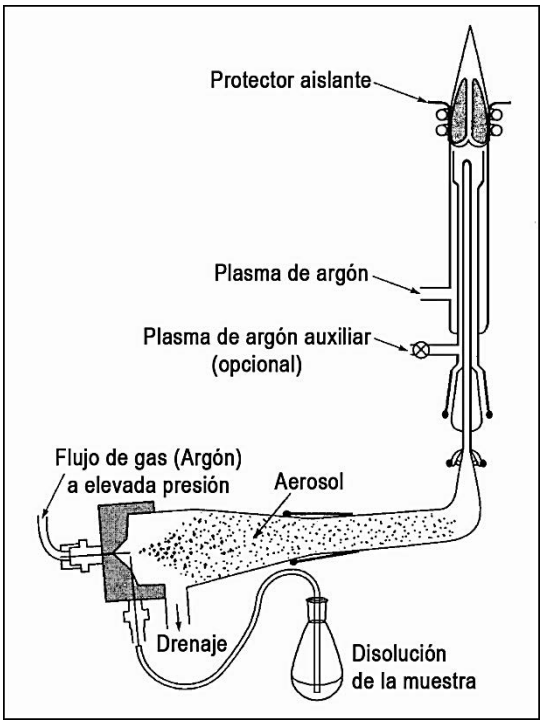


Figura 5.3. Típico nebulizador neumático para la inyección de la muestra en una fuente de plasma.

Los dispositivos más utilizados para la inyección de la muestra son los nebulizadores neumáticos, los cuales transforman el líquido en una fina niebla o aerosol. La figura 5.3 ilustra una típica disposición del mismo. En este caso, la muestra se nebuliza mediante un nebulizador de flujo cruzado con una comente de argón, y las gotitas finamente divididas resultantes se introducen dentro del plasma.

Otro método para la introducción de muestras líquidas y sólidas en un plasma es la vaporización electrotérmica. En este caso. La muestra se vaporiza en un horno similar a los descritos para la atomización electrotérmica en epígrafe 4.2.2. Sin embargo para las aplicaciones de plasma, el horno se utiliza únicamente para La introducción de la muestra y no para la atomización de la muestra. La vaporización se produce sobre una barra de grafito abierta y a continuación el vapor se conduce hasta la antorcha de plasma mediante un flujo de argón. La vaporización electrotérmica acoplada a una antorcha de plasma ofrece las ventajas de los hornos electrotérmicos de poder analizar micromuestras y de poseer bajos límites de detección, a la vez que mantiene el amplio intervalo lineal de trabajo, la ausencia de interferencias y la aptitud para el análisis multielemental del ICP.

Los dispositivos de introducción de muestras sólidas también son comercializados por varios fabricantes de instrumentos de ICP. Con estos sistemas de introducción de la muestra, la nube de vapor y partículas sólidas producida por la interacción de la muestra con un arco eléctrico, una chispa eléctrica o un haz de láser se transportan mediante un flujo de argón al interior de la antorcha, donde posteriormente se producirá la atomización y excitación.

Aspecto del plasma y espectros

Un plasma característico tiene un núcleo no transparente, blanco brillante y muy intenso, coronado por una cola en forma de llama. El núcleo, que sobresale algunos milímetros por encima del tubo, consiste en una emisión continua a la que se superpone el espectro atómico del argón. El origen de la emisión continua proviene aparentemente de la recombinación de los electrones con el argón y otros iones. En la zona situada entre 10 y 30 mm por encima del núcleo, la emisión continua se desvanece y el plasma es ópticamente transparente. Las observaciones espectrales por lo general se hacen a una altura de 15 a 20 mm por encima de la bobina de inducción. En esta zona la radiación de fondo está libre de las líneas del argón y resulta adecuada para el análisis, Muchas de las líneas analíticas más sensibles en esta zona del plasma provienen de iones, como Ca^{+}, Ca^{2+}, Cd^{+}, Cr^{2+} y Mn^{2+}.

Atomización e ionización de los analitos

La figura 5.4 muestra las temperaturas en varias zonas del plasma. En el momento en que los átomos de la muestra alcanzan el punto de observación habrán permanecido unos 2 ms temperaturas comprendidas entre 4000 y 8000 K. Estos tiempos y temperaturas son aproximadamente dos o tres veces mayores que los que se encuentran en las llamas de combustión más caloríficas (acetileno-óxido nitroso) utilizadas en los métodos de llama. En consecuencia, la atomización es más completa y hay menos problemas de interferencias químicas. Sorprendentemente, los efectos de interferencia por ionización son pequeños o inexistentes, debido probablemente a que La concentración de electrones que provienen de la ionización del argón es grande, comparada con la que resulta de la ionización de los componentes de la muestra.

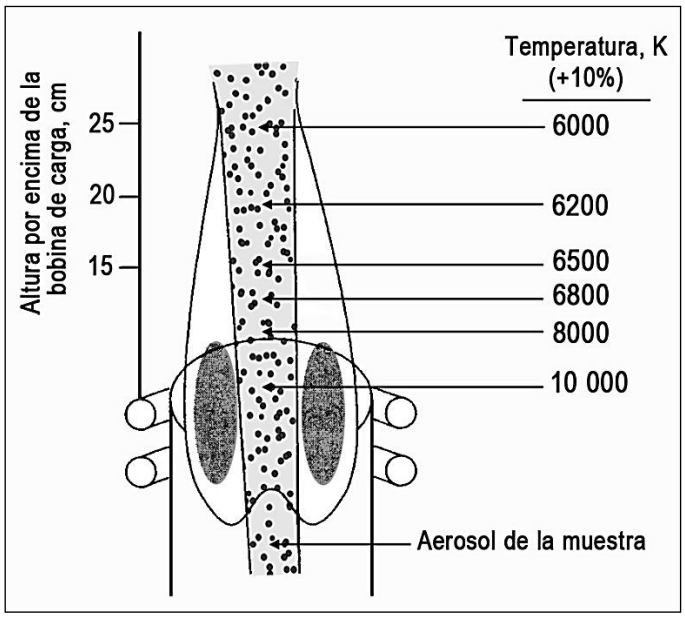


Figura 5.4. Temperaturas en una fuente característica de plasma de acoplamiento inductivo

Las fuentes de plasma presentan otras ventajas. Primero, la atomización se produce en un medio inerte desde el punto de vista químico, lo que tiende a aumentar el tiempo de vida del analito al evitar la formación de óxidos. Además, y a diferencia del arco, la chispa y la llama, la temperatura en la sección transversal del plasma es relativamente uniforme; como consecuencia no se producen efectos de autoabsorción y autoinversión. Así pues, suelen obtenerse curvas de calibrado lineales que cubren varios órdenes de magnitud de concentración del analito.

5.2.2. La fuente de plasma de corriente continua

El plasma de corriente continua se describió por primera vez en los años veinte y fue investigado sistemáticamente como fuente para la espectroscopia de emisión durante varias décadas. Sin embargo, hasta los años setenta no se diseñó una fuente de este tipo que pudiera competir con éxito con las fuentes de llama y de plasma de acoplamiento inductivo en términos de reproducibilidad.

La figura 5.5 muestra el esquema de una fuente de plasma de corriente continua comercial que resulta adecuada para la excitación de los espectros de emisión de una gran variedad de elementos. Esta fuente de chorro de plasma consiste en tres electrodos dispuestos en una configuración de "Y" invertida. Un ánodo de grafito se localiza en cada brazo de la "Y" y un cátodo de wolframio en la base invertida. El argón fluye desde los dos bloques anódicos hasta el cátodo. El chorro de plasma se forma al contactar momentáneamente el cátodo con los ánodos. Se ioniza el argón y se desarrolla una corriente (≈ 14 A) que genera iones adicionales que mantienen la corriente indefinidamente. La temperatura en el núcleo del arco es de unos 10000 K y en La zona de observación, de 5000 K. La muestra se aspira dentro del área entre los dos brazos de la "Y", donde se atomiza, excita y examina.

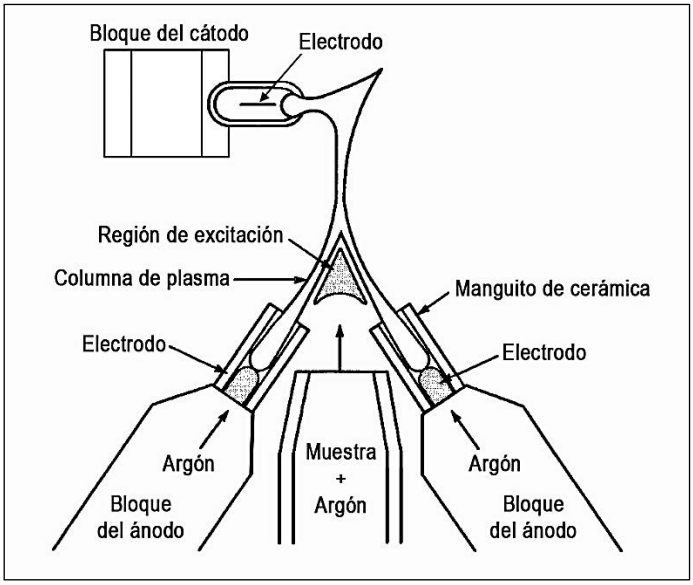


Figura 5.5. Fuente de plasma de corriente continua de tres electrodos

Los espectros producidos por un plasma de este tipo tienden a tener menos líneas que los producidos por un plasma de acoplamiento inductivo, y las líneas que aparecen provienen en su mayor parte de átomos más que de iones. La sensibilidad que se consigue con el plasma de corriente continua cubre un intervalo que va desde un orden de magnitud menor hasta aproximadamente la misma que la que se alcanza con el plasma de acoplamiento inductivo. La reproducibilidad de los dos sistemas es semejante. En el plasma de comente continua se requiere bastante menos argón, y la fuente de alimentación auxiliar es más sencilla y más barata. Por otra parte los electrodos de grafito se han de sustituir cada pocas horas, mientras que la fuente de plasma de acoplamiento inductivo requiere poco o ningún mantenimiento.

5.2.3. Aplicaciones de las fuentes de plasma

Las fuentes de plasma son ricas en líneas de emisión características, lo que hace que sean útiles para el análisis elemental tanto cualitativo como cuantitativo. Resulta incuestionable que las fuentes de plasma de acoplamiento inductivo y de corriente continua proporcionan datos analíticos cuantitativos mucho mejores que otras fuentes de emisión. La calidad de estos resultados radica en su gran estabilidad, bajo ruido, poca radiación de fondo y la ausencia de interferencias cuando se trabaja en unas condiciones experimentales apropiadas. Con respecto a los límites de detección, el funcionamiento de la fuente de plasma de acoplamiento inductivo es algo mejor que el de la fuente de plasma de corriente continua. Sin embargo, esta última cuesta menos comprarla y mantenerla, y para muchas aplicaciones analíticas resulta totalmente satisfactoria.

Preparación de la muestra

La espectroscopia de emisión de plasma de acoplamiento inductivo se utiliza principalmente para el análisis cualitativo y cuantitativo de muestras que están disueltas o en suspensión en disolventes acuosos u orgánicos. Los métodos para La preparación de dichas disoluciones son similares a los descritos en el capítulo 4, epígrafe 4.5.1 para los métodos de absorción atómica de llama. Sin embargo, con los de emisión de plasma, existe la posibilidad de analizar directamente muestras sólidas utilizando procedimientos de vaporización electrotérmica.

Elementos susceptibles de determinación

En principio, se pueden determinar todos los elementos metálicos por espectrometría de emisión de plasma. Para la determinación de boro, fósforo, nitrógeno, azufre y carbono se necesita un espectrómetro de vacío, porque las líneas de emisión de estos elementos se encuentran por debajo de 180 nm, zona en que absorben los componentes atmosféricos. Su utilidad para el análisis de metales alcalinos se encuentra limitada por dos razones: (1) las condiciones de trabajo que pueden adaptarse para la determinación de la mayoría de los otros elementos no son adecuadas para los metales alcalinos, y (2) las líneas más intensas del Li, K, Rb y Cs se sitúan en longitudes de onda del infrarrojo cercano,

lo que conduce a problemas de detección en muchos espectrómetros de plasma que están diseñados principalmente para la radiación ultravioleta. Debido a esta clase de problemas, la espectroscopia de emisión de plasma generalmente se limita a la determinación de aproximadamente 60 elementos.

Selección de la línea analítica

La mayoría de los elementos tienen varias líneas significativas que se pueden utilizar para su identificación y cuantificación. En varias publicaciones se puede encontrar, para más de 70 elementos, información sobre las líneas más significativas, indicando su longitud de onda con tres cifras decimales y su intensidad. Generalmente se puede encontrar una línea adecuada para la determinación de cualquier elemento. La selección dependerá de los elementos que se hallen en la muestra y de la posibilidad de solapamiento de líneas.

Análisis cualitativo

La espectrometría de emisión atómica con fuentes de plasma de argón tiene una gran utilidad desde el punto de vista cualitativo superando en este aspecto a la espectrometría de absorción atómica, por cuanto no es necesario emplear una lámpara diferente para la identificación de cada elemento y por lo tanto pueden realizarse identificaciones simultáneas haciendo un barrido a diferentes longitudes de onda, con la consecuente obtención de un espectro de líneas correspondientes a los diferentes elementos presentes en la muestra problema.

Análisis cuantitativo

Los procedimientos usados para el análisis cuantitativo son fundamentalmente las curvas de calibración y las curvas de adición de patrón, ya explicados con anterioridad en los epígrafes 3.7.2.2 (capítulo 3) y 4.5.3 (capítulo 4).

Las curvas de calibración o calibrado en espectrometría de emisión de plasma consisten la mayoría de las veces en una representación gráfica de la intensidad de corriente o de la tensión de salida del detector en función de la concentración del analito.

Con frecuencia, las curvas de calibrado son lineales, sin embargo, se encuentran desviaciones de la linealidad cuando se cubren intervalos grandes de concentración. La principal causa de la no linealidad es la autoabsorción, en la que la señal de salida disminuye como consecuencia de la absorción por parte de átomos no excitados del medio. La autoabsorción sólo comienza a ser evidente a elevadas concentraciones del analito y origina que la curva de calibrado se curve hacia el eje de abscisas. La no linealidad surge también de correcciones de fondo erróneas y de respuestas no lineales de los sistemas de detección.

Como en espectroscopia de absorción atómica, uno o más patrones deberían introducirse periódicamente para corregir los efectos de deriva instrumental. De forma general, la precisión se mejora cuando se miden concentraciones elevadas de analito.

En espectrometría de emisión se utiliza también con cierta frecuencia un tercer procedimiento de cuantificación conocido como *patrón interno*.

El método del patrón interno consiste en añadir a todas las muestras, blancos y patrones de referencia una cantidad fija de una sustancia que no esté presente en la muestra la cual se denomina patrón interno. El patrón interno deberá dar una señal similar a la del analito en la mayoría de los casos pero lo suficientemente diferente como para que ambas señales sean claramente diferenciables por el instrumento.

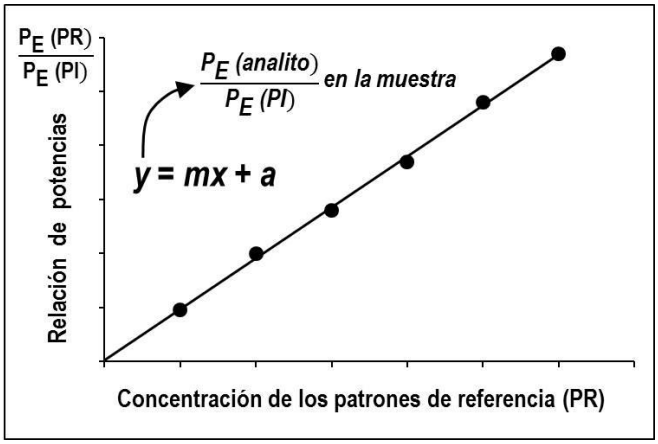


Figura 5.6. Gráfico de calibración por el método del patrón interno. P_E (PR) es la potencia emitida de los patrones de referencia y P_E (PI) es la potencia emitida del patrón interno.

Una vez añadido el patrón interno a la muestra y a los patrones de la curva de calibración, se mide en el equipo la potencia de la energía radiante emitida P_E por el analito (y sus patrones de referencia), así como la del patrón interno presente en todas las disoluciones. Estas lecturas pueden realizarse simultáneamente mediante un sistema de detección binario o de manera independiente por examen sucesivo a las longitudes de onda correspondientes al analito y al patrón interno.

En este caso se obtiene un juego de valores de concentración de los patrones de referencia vs. el cociente entre la señal de los patrones de referencia y la señal del patrón interno. Estos datos se procesan por regresión lineal obteniéndose una ecuación del tipo ***y= mx + a***.

El cálculo de la concentración del analito se realiza sustituyendo ***"y"*** por el cociente entre la señal del analito y la señal del patrón interno en la muestra. La figura 5.6 muestra un típico gráfico obtenido por el método del patrón interno.

El tratamiento estadístico para comprobar el ajuste del modelo a los datos experimentales es idéntico al explicado para una curva de calibración en el epígrafe 3.7.2.2 (capítulo 3).

Si se elige y se usa adecuadamente un patrón interno, se pueden compensar algunos errores aleatorios o sistemáticos. Así, si las señales del analito y del patrón interno tienen una respuesta proporcional al error aleatorio instrumental y a las fluctuaciones del método debido a que la relación entre dichas señales es independiente de dichas fluctuaciones. Si ambas señales se modifican de la misma forma por el efecto de la matriz, también se compensan en ambas dichos efectos.

La mayor dificultad para aplicar el método del patrón interno es encontrar la sustancia adecuada que sirva a estos efectos, así como para incorporarla a las muestras y a los patrones de forma reproducible. Se debe asegurar la ausencia de patrón interno en la matriz de la muestra de tal forma que la única procedencia del patrón sea la cantidad añadida. Por ejemplo, el litio es un patrón interno adecuado para las determinaciones de sodio o potasio en suero sanguíneo, debido a que el comportamiento químico del litio es similar al de ambos analitos pero no aparece de forma natural en la sangre.

Así, el método del patrón interno se utiliza, con frecuencia, para la determinación de elementos traza en metales por espectroscopia de emisión.

Interferencias

En las fuentes de plasma, las interferencias químicas y de matriz son significativamente menores que con otros atomizadores, tal como se ha subrayado anteriormente. Sin embargo, a concentraciones bajas de analito, la emisión de fondo debida a la recombinación de iones de argón con electrones es lo suficientemente intensa como para requerir correcciones cuidadosas. Hoy en día muchos instrumentos de espectrometría de emisión en plasma están equipados con elementos ópticos que permiten realizar estas correcciones.

Límites de detección

Por lo general, los límites de detección obtenidos con la fuente de plasma de acoplamiento inductivo son comparables o mejores que los que proporcionan otros procedimientos espectrales atómicos. En la tabla 5.2 se comparan estos límites con las de algunos de esos métodos. Es de destacar que para niveles de diez partes por billón (ppb) o menos se pueden detectar más elementos mediante excitación con plasma que con otros métodos de emisión o absorción.

Tabla 5.2. Comparación de los límites de detección de varios métodos espectrales atómicos

Método	Número de elementos detectados a una concentración de				
	< 1 ppb	1–10 ppb	11–100 ppb	101–500 ppb	> 500 ppb
Emisión atómica de plasma (ICP)	9	32	14	6	0
Emisión atómica de llama	4	12	19	6	19
Absorción atómica de llama	1	14	25	3	14

5.3. ESPECTROSCOPIA DE EMISIÓN CON FUENTES DE ARCO Y CHISPA

Las espectroscopias con fuentes de arco y de chispa fueron los primeros métodos instrumentales más utilizados en el análisis. Estás técnicas, que empezaron a sustituir en los años veinte a los métodos gravimétricos y volumétricos clásicos para el análisis elemental, están basadas en la obtención mediante excitación del espectro de emisión de los elementos por medio de arcos eléctricos o chispas

eléctricas. Estos espectros permiten la determinación cualitativa y cuantitativa de elementos metálicos en varios tipos de muestras, incluyendo metales, aleaciones, suelos, alimentos, fármacos, minerales y rocas. Las fuentes de arco y chispa todavía encuentran un uso considerable en análisis cualitativo y semicuantitativo, sin embargo, en análisis cuantitativos han sido notablemente desplazados por los métodos de plasma.

En las fuentes de arco y chispa, la excitación de la muestra se produce en el pequeño espacio existente entre un par de electrodos. El paso de electricidad entre los electrodos a través de este pequeño espacio proporciona la energía necesaria para atomizar la muestra y producir átomos o iones en estado electrónico excitado.

Actualmente, los métodos con fuentes de arco o de chispa se aplican principalmente al análisis elemental de muestras sólidas, ya que las muestras liquidas o gaseosas se manipulan mucho mejor por espectrometría de emisión de plasma, que ya se ha descrito en los epígrafes anteriores.

5.3.1. Espectroscopia de emisión con fuente de arco

La fuente de arco usual para un análisis espectroquímico está constituida por un par de electrodos de grafito o de metal separados unos pocos milímetros. El arco se enciende mediante una chispa de baja intensidad de corriente que provoca la formación momentánea de iones que transforman en conductor el espacio entre los electrodos; una vez iniciado el arco, la ionización térmica mantiene la corriente. Alternativamente, puede iniciarse el arco juntando los electrodos para producir el calor necesario para la ionización y luego se separan a la distancia deseada.

En un arco característico, se utilizan intensidades de comente de 1 a 30 A. Una fuente de corriente continua tiene por lo general una tensión de circuito abierto de unos 200 V; y una fuente de arco de corriente alterna trabaja en un intervalo de alta tensión de 2200 a 4400 V o en un intervalo de baja tensión de 100 a 400 V. En ambos tipos, el arco se extingue al final de cada mitad del ciclo. En el tipo de alta tensión, el arco se vuelve a encender espontáneamente mientras que en el arco de baja tensión, se vuelve a encender por medio de la descarga de una chispa de baja intensidad de corriente.

Características de las fuentes de arco

La electricidad se produce en un arco mediante el movimiento de los electrones y los iones que se forman por ionización térmica; la elevada temperatura que se produce es el resultado de la resistencia de los cationes a este movimiento en el espacio donde se produce el arco. Por tanto, la temperatura del arco depende de la composición del plasma, que a su vez depende de la velocidad de formación de partículas atómicas a partir de la muestra y de los electrodos. La temperatura característica del plasma es de 4000 a 5000 K.

Los espectros obtenidos en un típico arco son ricos en líneas intensas en el caso de átomos y contienen un número menor de líneas en el caso de especies iónicas. Es de destacar que en las colecciones de datos de líneas espectrales, las longitudes de onda van seguidas con frecuencia por I. II y III para indicar la fuente de la línea, cuyo significado es: átomo neutro, ion con una sola carga e ion con dos cargas, respectivamente.

Velocidad de emisión.

Sc ha demostrado experimentalmente que la velocidad a la que las especies se volatilizan y se excitan difiere considerablemente de unas a otras. Los espectros de algunas especies aparecen pronto y después desaparecen a medida que la muestra se consume; los espectros de otras especies alcanzan su máxima intensidad a tiempos mayores. Por ello, es necesario integrar las señales de emisión durante un minuto o más. Para muestras pulverizadas, la señal para las líneas de varios elementos generalmente surge rápidamente durante este período y luego disminuye hasta cero cuando las especies desaparecen por la vaporización. Debido a este comportamiento, las muestras pulverizadas a menudo se queman hasta que se consumen por completo; las señales de salida integradas sirven como variables analíticas.

Aplicaciones de las fuentes de arco

Las fuentes de arco son particularmente útiles para el análisis cualitativo y semicuantitativo de muestras no metálicas, como suelos, muestras vegetales, alimentos, fármacos, rocas y minerales. Normalmente, los tiempos de excitación y las corrientes del arco se ajustan de tal manera que se produzca la volatilización completa de la muestra, siendo habituales las corrientes de 5 a 30 A durante 20 a 200 s. Normalmente de 2 a 50 mg de muestra en forma de polvo, pequeños trozos, molienda o limaduras, se mezclan con una cantidad pesada de grafito y se introducen en la cavidad de los electrodos de grafito. Generalmente, el electrodo portamuestras hace de ánodo y el segundo contraelectrodo de grafito actúa de cátodo.

En análisis cualitativo y semicuantitativo de muestras no rutinarias, todavía se utiliza de manera habitual el registro fotográfico. Se pueden obtener varios espectros en una placa moviendo verticalmente la cámara tras cada excitación. Generalmente, se registran también uno o más espectros del hierro, para alinear la placa o la película con una placa maestra que muestra la localización de las líneas características.

Se han descrito numerosos métodos espectrográficos semicuantitativos que proporcionan datos de concentración fiables dentro del intervalo del 30 al 200 por 100 respecto a la cantidad real de un elemento presente en la muestra. Dichos métodos son útiles cuando la preparación de buenos patrones es cara. Algunos de estos procedimientos se basan en la vaporización completa en el arco de una cantidad medida de muestra (1 a 10 mg). La estimación de la

concentración se establece conociendo la cantidad mínima necesaria de un elemento para provocar la aparición de las distintas series de líneas. En otros métodos, se mide el ennegrecimiento de las líneas elementales y se compara con la línea de un material añadido a la matriz o con el fondo.

La excitación con arco también se utiliza para análisis cuantitativo. Sin embargo, la precisión obtenida con el arco es significativamente más pobre que con la chispa y mucho más pobre que con el plasma o la llama. Además, las intensidades de emisión de las muestras sólidas dependen en gran medida de la muestra. Como consecuencia, es necesario igualar la matriz en los patrones y en las muestras para obtener resultados satisfactorios. Para solucionar parcialmente este problema, siempre se utiliza el método de adición de patrón.

5.3.2. Fuentes de chispa y espectros de chispa

Se han desarrollado diversos circuitos que producen chispas de alta tensión para espectroscopia de emisión. Se ha comprobado que una chispa intermitente que siempre se propaga en la misma dirección proporciona mayor precisión y menor deriva de la emisión radiante. Por este motivo, a menudo la tensión de la línea de corriente alterna se rectifica antes de subirla de 10 a 50 kV en una bobina. Se utiliza un conjunto de circuitos de estado sólido para el control de la frecuencia y la duración de la chispa. Por lo general, con una corriente de 60 Hz se producen cuatro descargas de chispa por cada semiciclo.

Con una chispa de alta tensión, la corriente promedio es generalmente bastante menor que en un arco típico, siendo del orden de unas pocas décimas de amperio. Por otra parte, en la fase inicial de la descarga, la corriente instantánea puede sobrepasar los 1000 A; en este caso, la electricidad circula por un canal estrecho que ocupa una minúscula parte del espacio total en el que se produce la chispa. La temperatura en esta región puede llegar a ser de 4000 K. Así, mientras que la temperatura media de una fuente de chispa es mucho menor que la de un arco, la energía en el pequeño volumen del canal puede ser varias veces mayor. Como consecuencia, los espectros de iones son más pronunciados en una chispa de alta tensión que en un arco. Por ello, los espectroscopistas a menudo denominan a las líneas emitidas por los iones "líneas de chispa".

Aplicaciones de la espectroscopia con fuente de chispa

Los análisis cuantitativos con chispa requieren el control preciso de muchas variables que intervienen en la preparación y excitación de la muestra, y también en el procesado de la película en los espectrógrafos. Además, las medidas cuantitativas requieren la preparación cuidadosa de una serie de patrones para el calibrado; los cuales deberán aproximarse lo más posible a la composición y propiedades físicas de las muestras a analizar. Generalmente los análisis por fuente de chispa se basan en la relación de la intensidad de la línea del analito respecto a la de una línea del patrón interno (normalmente la línea de un componente principal de la muestra). En condiciones ideales, se pueden obtener

desviaciones estándar relativas de pequeño porcentaje en las medidas espectrales con fuente de chispa.

Actualmente, la principal aplicación de la espectroscopia de emisión con fuente de chispa es la identificación y análisis de metales y otros materiales conductores. Cuando hay que evitar disolver la muestra por razones de tiempo, se escoge esta técnica antes que la espectrometría de plasma. La detección se realiza normalmente con un policromador equipado con tubos fotomultiplicadores. De hecho, algunos espectrómetros modernos van equipados con fuentes intercambiables, que permiten excitar por medio de plasmas, arcos, chispas, descarga luminiscente y láseres.

5.4. FUENTES DE EMISIÓN DE LLAMA

Durante muchos años, las llamas se han utilizado para obtener los espectros de emisión por excitación de diversos elementos, y los más modernos espectrómetros de absorción atómica están adaptados para trabajar en la modalidad de emisión de llama. Sin embargo, las llamas no se utilizan mucho para esto, ya que la modalidad de absorción proporciona resultados tan buenos o mejores en cuanto a exactitud, conveniencia y límites de detección para la mayoría de las determinaciones de un único elemento.

Para análisis multielemental las fuentes de plasma son bastante superiores a las llamas en la mayoría de los aspectos. Por ello, la espectrometría de emisión de llama actualmente tiene poca utilidad, excepto en la determinación de metales alcalinos y ocasionalmente, de calcio. Estos elementos se excitan a temperaturas relativamente bajas para dar espectros que son notablemente sencillos y exentos de interferencias de otras especies metálicas. Los espectros de metales alcalinos constan de unas pocas líneas bastante intensas, muchas de las cuales se encuentran en la región del visible y que permiten perfectamente cuantificar las medidas de emisión.

Debido a esta simplicidad espectral, los fotómetros de filtros sencillos son generalmente suficientes para las determinaciones rutinarias de metales alcalinos y alcalinotérreos. Se utilizan llamas frías para eliminar la excitación de la mayoría de los oros metales. Como consecuencia, los espectros son sencillos, y se pueden utilizar filtros de interferencia para aislar la línea de emisión deseada.

Los métodos de preparación de muestras son similares a los descritos en el capítulo 4, epígrafe 4.5.1 para los métodos de absorción atómica de llama. Así mismo los procedimientos usados para el análisis cuantitativo son fundamentalmente las curvas de calibración y las curvas de adición de patrón, ya explicados con anterioridad en los epígrafes 3.7.2.2 (capítulo 3) y 4.5.3 (capítulo 4).

Trabajo Independiente

1. *Consulte los apéndices B-2, B-3, B-4, B-5 y B-6, en los que aparece un resumen del presente capítulo. Céntrese en la comparación de los métodos de absorción molecular, absorción atómica y emisión atómica.*
2. *Resuelva el ejercicio 9 que aparece en el* ***Capítulo 14 / epígrafe 14.1. Ejercicios propuestos****, centrándose en el análisis de la técnica 4 (Determinación de potasio en zumo de uvas).*

BIBLIOGRAFÍA

1. Bermejo, R; Moreno, A. (2014). Análisis Instrumental. Editorial Síntesis S. A. Madrid.
2. Cabrera, A. y Lines, G. (1985). Análisis Instrumental. Métodos ópticos. Tomo I. Ed. Pueblo y Educación, La Habana. Cuba.
3. Cano, B. (2018). Guía de laboratorio de Análisis Instrumental. Corporación Universitaria Rafael Núñez.
4. Fernández, L; Rojas, L; Lapo, B. (2015). Desarrollos experimentales en Análisis Instrumental. Ediciones UTMACH.
5. Rubinson, K y Rubinson, J. (2001). Análisis Instrumental. Pearson Educación S.A. Madrid.
6. Sayago, A; Hernanz, D; Gallo, V; Beltrán, R. (2011). Adaptación de las prácticas de Análisis Instrumental al Espacio de Convergencia Europeo. Elaboración de Material Didáctico. Formación Universitaria – Vol. 4 Nº 1.
7. Sierra, M; Gómez, S; Morante, S; Pérez, D; Sanchez, A; Gañan, J. (2015). Análisis Instrumental. Experiencia de Innovación Docente en la URJC. Ed. Dykinson. Madrid.
8. Skoog, D; Holler, F y Nieman, T. (2001). Principios de Análisis Instrumental. Quinta edición. McGraw-Hill/Interamericana de España, S.A.U.
9. Skoog, D; Holler, J; Crouch, S. (2008). Principios de análisis instrumental. 6ta ed. Cengage Learning Editores.

6 Espectrometría de fluorescencia molecular

6.1. TEORÍA DE LA FLUORESCENCIA

La fluorescencia tiene lugar en sistemas químicos gaseosos, líquidos y sólidos, tanto sencillos como complejos. El tipo más sencillo de fluorescencia es el que presentan los vapores atómicos diluidos. Por ejemplo, los electrones 3s de los átomos de sodio vaporizados pueden ser excitados al estado 3p mediante la absorción de radiación de longitudes de onda de 589,6 y 589,0 nm. Después de 10^{-8} a 10^{-5} s, los electrones vuelven al estado fundamental emitiendo radiación de estas dos mismas longitudes de onda en todas las direcciones. Este tipo de fluorescencia, en la cual la radiación absorbida es reemitida sin cambio de frecuencia, es decir la energía emitida es igual a la absorbida, se conoce como radiación de resonancia o fluorescencia de resonancia.

Muchas especies moleculares también presentan fluorescencia de resonancia. Sin embargo, es mucho más frecuente encontrar bandas de fluorescencia molecular centradas en longitudes de onda más largas que la línea de resonancia, es decir que la energía emitida es menor que la absorbida. Este desplazamiento hacia longitudes de onda más largas, o menores energías, se denomina desplazamiento Stokes.

6.1.1. Diagrama de niveles de energía para las moléculas fluorescentes

La figura 6.1 es un diagrama de niveles de energía parcial para una molécula fluorescente característica. La línea horizontal gruesa que se encuentra en la parte inferior de la figura representa la energía del estado fundamental de la molécula, y se designa E_0. A temperatura ambiente, este estado representa la energía de prácticamente todas Las moléculas en una disolución.

Las dos líneas gruesas superiores representan los estados electrónicos excitados primero (E_1) y segundo (E_2), en tanto las líneas horizontales más delgadas son los niveles de energía de los estados vibracionales fundamentales asociados a los dos estados electrónicos excitados.

Como muestra la figura 6.1, la excitación de esta molécula se puede producir por la absorción de dos bandas de radiación, una centrada alrededor de la longitud de onda λ_1 (E_0 — E_1) y la segunda alrededor de la longitud de onda más corta λ_2 (E_0 — E_2). Obsérvese que el proceso de excitación da como resultado la conversión de la molécula a cualquiera de los diversos estados excitados vibracionales asociados a los niveles electrónicos excitados.

Velocidades de absorción y de emisión

La velocidad a la cual se absorbe un fotón de radiación es enorme y el proceso requiere del orden de 10^{-15} a 10^{-14} s. Por otro lado, la emisión fluorescente tiene lugar a una velocidad significativamente más lenta. El tiempo de vida del estado excitado se relaciona inversamente con la absortividad molar del pico de absorción correspondiente al proceso de excitación. Por tanto, para absortividades molares comprendidas entre 10^3 y 10^5, los tiempos de vida del estado excitado son de 10^{-9} a 10^{-7} s. Para sistemas débilmente absorbentes, donde la probabilidad del proceso de transición es más pequeña, los tiempos de vida pueden ser tan largos como de 10^{-6} a 10^{-5} s.

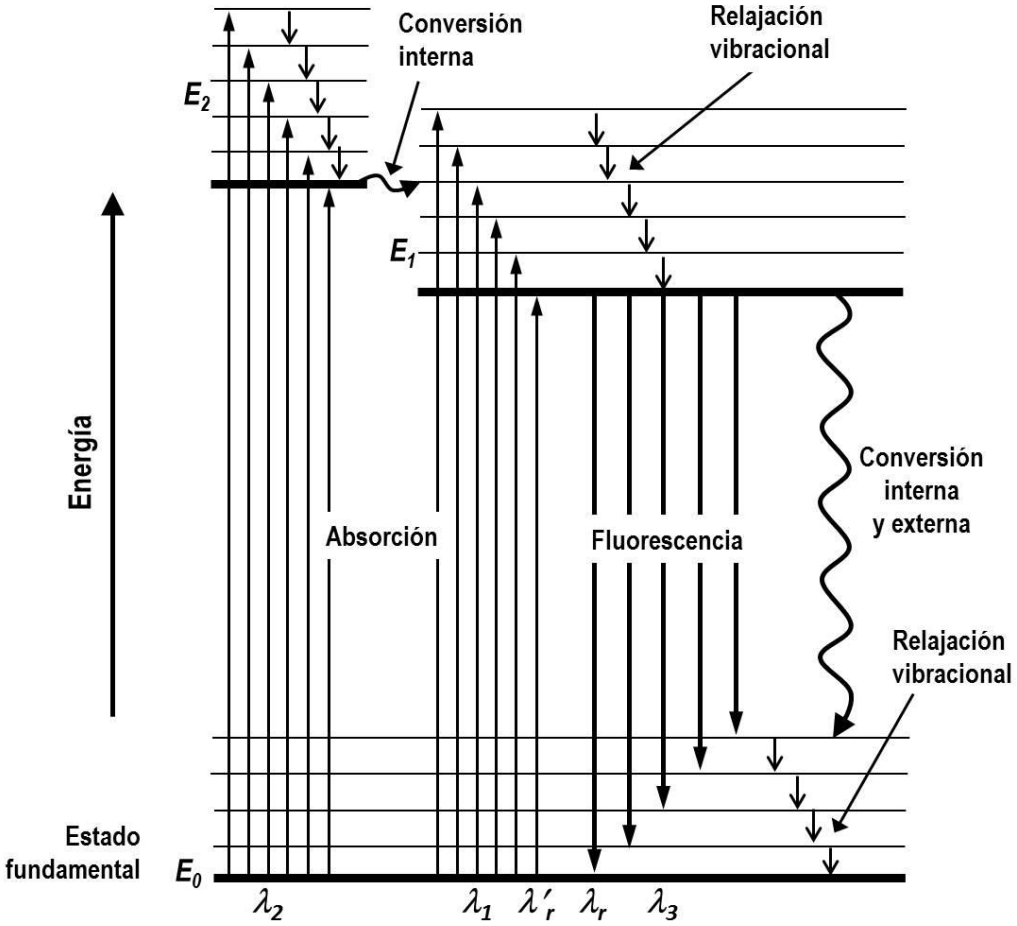


Figura 6.1. Diagrama de energía parcial para un sistema fluorescente

6.1.2. Procesos de desactivación

Una molécula excitada puede volver a su estado fundamental mediante una combinación de varias etapas. Como muestran las flechas verticales de puntas negras de la figura 6.1, el fenómeno de fluorescencia conlleva la emisión de un fotón de radiación. Las otras etapas de desactivación, indicadas por flechas onduladas o pequeñas flechas de punta abierta, son procesos no radiantes. El camino más propicio hacia el estado fundamental es aquel que minimiza el

tiempo de vida del estado excitado. Por ello, si la desactivación por fluorescencia es más rápida que los procesos no radiantes, se observa tal emisión, mientras que si la desactivación no radiante tiene una constante de velocidad más favorable, la fluorescencia desaparece o es menos intensa.

La fluorescencia está limitada a un número relativamente pequeño de sistemas que incorporan características estructurales y ambientales que hacen que la velocidad de los procesos de relajación o desactivación no radiantes se hagan tan lentos hasta el punto en el que la reacción de emisión puede competir cinéticamente con ellos. La información referente a los procesos de emisión es suficientemente completa para permitir un cálculo cuantitativo de estas velocidades. Sin embargo, la comprensión de los otros caminos de desactivación no radiantes es, en el mejor de los casos, rudimentaria para estos procesos y sólo se pueden realizar afirmaciones o especulaciones cualitativas sobre las velocidades y los mecanismos. No obstante, la interpretación de la fluorescencia requiere la consideración de estos otros caminos.

Relajación vibracional

Como ya se ha mencionado, y se muestra en la figura 6.1, una molécula puede promocionarse a cualquiera de los diversos niveles vibracionales durante el proceso de excitación electrónico. Sin embargo, en disolución, el exceso de energía vibracional se pierde inmediatamente como consecuencia de las colisiones entre las moléculas de las especies excitadas y las del disolvente; el resultado es una transferencia de energía y un incremento minúsculo de la temperatura del disolvente. Este proceso de relajación se conoce como relajación vibracional y es tan eficaz que el tiempo de vida medio de una molécula excitada vibracionalmente es 10^{-12} s o menor, lo que representa un período significativamente más corto que el tiempo de vida medio de un estado excitado electrónicamente. Como consecuencia, la fluorescencia de la disolución, siempre incluye una transición desde el nivel vibracional más bajo de un estado electrónico excitado. Sin embargo, se producen varios picos muy próximos ya que el electrón puede volver a cualquiera de los niveles vibracionales del estado fundamental (figura 6.1) y después caerá rápidamente al nivel vibracional más bajo del estado electrónico fundamental mediante una nueva relajación vibracional.

El fenómeno de relajación vibracional conduce entonces a la pérdida de parte de energía radiante absorbida en forma de calor, y es el principal responsable de que la banda de fluorescencia para una transición electrónica dada se desplace hacia menores frecuencias o longitudes de onda más largas respecto a la banda de absorción (desplazamiento Stokes); es decir, que la energía emitida sea menor que la absorbida. En la figura 6.1 la longitud de onda de la radiación absorbida que produce el pico de resonancia λ_r, se representa como λ'_r .

Conversión interna

El término conversión interna describe los procesos intermoleculares por los cuales la molécula pasa a un estado electrónico de más baja energía sin emisión de radiación. Estos procesos ni están bien definidos ni se entienden bien, pero es evidente que suelen ser muy eficaces, ya que son relativamente pocos los compuestos que presentan fluorescencia.

La conversión interna parece ser particularmente eficaz cuando dos niveles de energía electrónicos están lo suficientemente próximos como para que haya un solapamiento de los niveles de energía vibracional. Esta situación es la que presentan los dos estados excitados (E_1 y E_2) en la figura 6.1. Como muestran los solapamientos, las energías potenciales de los dos estados excitados son idénticas; esta igualdad permite, aparentemente, una transición eficaz. La conversión interna a través de los niveles vibracionales solapados es normalmente más probable que la pérdida de energía por fluorescencia desde un estado excitado más alto.

Así, refiriéndonos de nuevo a la figura 6.1, la excitación producida por la banda de radiación centrada en λ_2 ($E_0 - E_2$), provoca normalmente una banda de fluorescencia centrada en una longitud de onda λ_3 ($E_1 - E_0$), y sin embargo no aparece la banda que resultaría de una transición $E_2 - E_0$. En este caso la molécula excitada pasa del estado electrónico más alto E_2 al estado vibracional más bajo del estado electrónico excitado más bajo E_1 por una serie de relajaciones vibracionales, una conversión interna y nuevas relajaciones posteriores hasta E_0. En estas circunstancias, la fluorescencia tiene lugar sólo a λ_3, independientemente de que las radiaciones de longitud de onda λ_1 y λ_2 sean las responsables de la excitación.

Los mecanismos del proceso de conversión interna E_1 — E_0 que se muestra en la figura 6.1 no se entienden bien, pero sin duda ocurren con rapidez. Los niveles vibracionales del estado fundamental E_0 se pueden solapar con los del primer estado electrónico excitado; bajo tales circunstancias la desactivación ocurrirá rápidamente por el mecanismo antes descrito. La desactivación por transferencia de energía a través de los niveles vibracionales solapados tiene lugar tan rápidamente que no hay tiempo para que tenga lugar la fluorescencia.

La conversión interna puede también dar lugar al fenómeno de la predisociación. En este caso, el electrón se mueve desde un estado electrónico más alto hacia un nivel vibracional superior de un estado electrónico más bajo en el que la energía vibracional es lo suficientemente grande como para provocar la ruptura de un enlace. En una molécula grande, hay una probabilidad apreciable de que existan enlaces con fuerzas menores que la energía de excitación electrónica de los cromóforos. La ruptura de estos enlaces puede ocurrir como consecuencia de la absorción por un cromóforo, seguida de la conversión interna de la energía electrónica a la energía vibracional, asociada con el enlace débil.

La predisociación se diferenciaría de la disociación en que en esta última, la radiación absorbida excita al electrón de un cromóforo directamente a un nivel vibracional suficientemente alto para provocar la ruptura del enlace del grupo cromóforo y no incluye la conversión interna. Los procesos de disociación también compiten con los procesos de fluorescencia.

Conversión externa

La desactivación de un estado electrónico excitado puede incluir la interacción y la transferencia de energía entre la molécula excitada y el disolvente u otros solutos. Estos procesos se llaman conversión externa o amortiguación colisional. La evidencia de la conversión externa incluye el marcado efecto que ejerce el disolvente sobre la intensidad de fluorescencia; además, aquellas condiciones que tienden a reducir el número de colisiones entre partículas (baja temperatura y elevada viscosidad) tienden, generalmente, a aumentar la fluorescencia. Debe aclararse que los detalles de los procesos de conversión externa no se conocen bien.

Las transiciones no radiantes al estado fundamental desde los estados excitados más bajos (figura 6.1) incluyen, probablemente, conversiones externas al igual que conversiones internas.

6.2. VARIABLES QUE AFECTAN A LA FLUORESCENCIA.

Tanto la estructura molecular como el entorno químico van a influir en que una sustancia sea o no fluorescente, así como también determinan la intensidad de emisión cuando tiene lugar la fluorescencia. A continuación se considerarán brevemente los efectos de algunas de estas variables.

6.2.1. Rendimiento cuántico

El rendimiento cuántico, o la eficacia cuántica, de fluorescencia (ϕ) es simplemente la relación entre el número de moléculas que emiten fluorescencia respecto al número total de moléculas excitadas. Para moléculas altamente fluorescentes como la fluoresceína, la eficacia cuántica, bajo determinadas condiciones, se aproxima a la unidad, mientras que las especies químicas que no presentan una fluorescencia apreciable tienen eficacias que se aproximan a cero.

$$\emptyset = \frac{\textit{Número de moléculas que emiten fluorescencia}}{\textit{Número total de moléculas excitadas}}$$

La figura 6.1 y la discusión sobre los procesos de desactivación sugieren que el rendimiento cuántico de fluorescencia (ϕ) para un compuesto se puede calcular a partir de las constantes de velocidad relativas k_X de los procesos por los que el estado excitado más bajo se desactiva, es decir: fluorescencia (k_F), conversión interna (k_{CI}), predisociación (k_{PD}), disociación (k_D) y conversión externa (k_{CE}). Estas relaciones se puede expresar por la ecuación:

$$\emptyset = \frac{k_F}{K_F + K_{CI} + K_{PD} + K_D + K_{CE}} \quad (7.1)$$

donde los términos k son las constantes de velocidad respectivas para los diversos procesos antes enumerados.

Esta ecuación permite una interpretación cualitativa de muchos de los factores estructurales y del entorno que influyen en la intensidad de fluorescencia. Aquellas variables que conducen a valores altos para la constante de velocidad de la fluorescencia k_F y a valores bajos para los otros términos de k exaltan la fluorescencia. En otras palabras cuando los procesos de conversión interna, predisociación, disociación y conversión externa experimenten constantes de velocidad menores que el proceso de emisión de energía radiante, la molécula tendrá una alta probabilidad de fluorescer. La magnitud de k_F, la constante de velocidad de la predisociación k_{PD} y la constante de velocidad de la disociación k_D dependen principalmente de la estructura química; el resto de constantes están fuertemente influenciadas por el entorno y en menor medida por la estructura.

6.2.2. Tipos de transiciones en fluorescencia

Es importante resaltar que la fluorescencia rara vez es consecuencia de la absorción de radiación ultravioleta de longitud de onda menor de 250 nm, ya que tal radiación es suficientemente energética como para producir la desactivación de los estados excitados por predisociación o disociación. Por ejemplo, una radiación de 200 nm corresponde a aproximadamente 140 kcal/mol y la mayoría de las moléculas tienen al menos algún enlace que se puede romper con energías de esta magnitud. Como consecuencia, rara vez se observa fluorescencia debida a transiciones $\sigma^* \rightarrow \sigma$, en cambio, este tipo de emisión está asociada a los procesos menos energéticos $\pi^* \rightarrow \pi$ y $\pi^* \rightarrow n$.

Como ya se ha dicho, una molécula en su estado electrónico excitado normalmente pasa a su estado excitado más bajo mediante una serie de relajaciones vibracionales rápidas y conversiones internas que no producen emisión de radiación. De esta manera, la fluorescencia surge, generalmente, de una transición desde el nivel vibracional más bajo del primer estado electrónico excitado a uno de los niveles vibracionales del estado electrónico fundamental. Así, para la mayoría de los compuestos fluorescentes, la radiación se produce por una transición $n \rightarrow \pi^*$ o $\pi \rightarrow \pi^*$, dependiendo de cuál de ellas sea la menos energética.

6.2.3. Eficacia cuántica y tipo de transición

Empíricamente se observa que la fluorescencia se encuentra con más frecuencia en los compuestos en los que la transición de más baja energía es del tipo $\pi \rightarrow \pi^*$ que en aquellos compuestos en los que la transición de menor energía es del tipo $n \rightarrow \pi^*$, es decir, la eficacia cuántica es mayor para las transiciones $\pi^* \rightarrow \pi$.

La mayor eficacia cuántica asociada a la transición $\pi \rightarrow \pi^*$ se puede explicar por el hecho de que la absortividad molar de una transición $\pi \rightarrow \pi^*$ es normalmente

de 100 a 1000 veces superior que a la de un proceso n $\rightarrow \pi^*$ y este valor representa una medida de la probabilidad de la transición en ambas direcciones. Así, el tiempo de vida inherente asociado con una transición $\pi \rightarrow \pi^*$ es más corto (10^{-9} a 10^{-7} s) comparado con 10^{-7} a 10^{-5} s para una transición n $\rightarrow \pi^*$ y k_F en la ecuación 7.1 es mayor.

En resumen, la fluorescencia está más asociada con transiciones $\pi \rightarrow \pi^*$, ya que tales transiciones presentan tiempos de vida medios más cortos (k_F es mayor) y porque es menos probable que tengan lugar los procesos de desactivación que compiten con la fluorescencia.

6.2.4. Fluorescencia y estructura

La fluorescencia más intensa y la más útil es la que presentan los compuestos que contienen grupos funcionales aromáticos con transiciones $\pi \rightarrow \pi^*$ de baja energía. Los compuestos que contienen grupos carbonilo en estructuras alifáticas y alicíclicas o estructuras con dobles enlaces altamente conjugados también pueden presentar fluorescencia, pero el número de estos compuestos es pequeño comparado con el número de sistemas aromáticos.

La mayoría de los hidrocarburos aromáticos no sustituidos son fluorescentes en disolución, la eficacia cuántica normalmente aumenta con el número de anillos y con su grado de condensación. Los heterociclos sencillos, como la piridina, el furano, el tiofeno y el pirrol, no presentan fluorescencia; en tanto las estructuras condensadas con éstas normalmente sí la presentan. En los heterociclos con nitrógeno, se cree que la transición electrónica de más baja energía implica a un sistema n $\rightarrow \pi^*$, que rápidamente se transforma en un estado triplete e impide la fluorescencia. Sin embargo, la condensación de anillos bencénicos para dar núcleos heterocíclicos, da lugar a un aumento en la absortividad molar del pico de absorción. En estas estructuras, el tiempo de vida del estado excitado es más corto y se observa fluorescencia en compuestos como la quinolina, la isoquinolina y el indol. La figura 6.2 ilustra lo explicado.

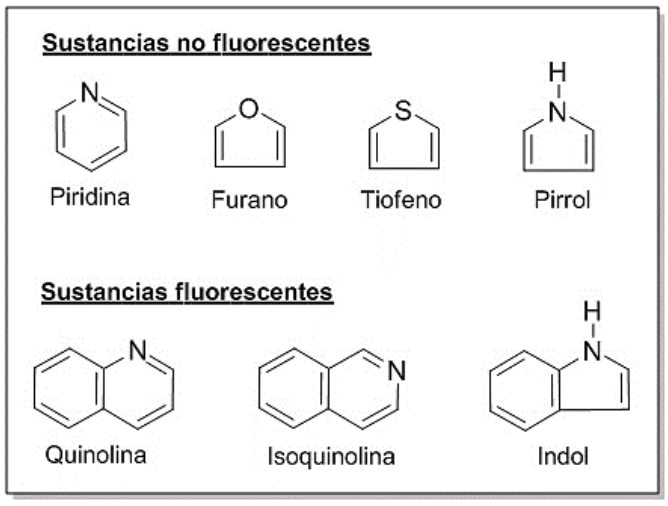


Figura 6.2. Efecto de la condensación estructural en la fluorescencia

La sustitución en el anillo bencénico provoca desplazamientos en la longitud de onda de los máximos de absorción y los correspondientes cambios en los picos de fluorescencia. Además, la sustitución afecta frecuentemente a la eficacia de la fluorescencia; alguno de estos efectos se ilustran con los datos de los derivados bencénicos de la tabla 6.1.

Tabla 6.1. Efecto de los sustituyentes en la fluorescencia del benceno

Compuesto	Fórmula	Longitud de onda de fluorescencia, nm	Intensidad de fluorescencia relativa
Benceno	C_6H_6	270-310	10
Tolueno	$C_6H_5CH_3$	270-320	17
Propilbenceno	$C_6H_5C_3H_7$	270-320	17
Fluorobenceno	C_6H_5F	270-320	10
Clorobenceno	C_6H_5Cl	275-345	7
Bromobenceno	C_6H_5Br	290-380	5
Yodobenceno	C_6H_5I	-	0
Fenol	C_6H_5OH	285-365	18
Ion fenolato	$C_6H_5O^-$	310-400	10
Anisol	$C_6H_5OCH_3$	285-345	20
Anilina	$C_6H_5NH_2$	310-415	20
Ion anilinio	$C_6H_5NH_3^+$	-	0
Acido benzoico	C_6H_5COOH	310-390	3
Benzonitrilo	C_6H_5CN	280-360	20
Nitrobenceno	$C_6H_5NO_2$	-	0

6.2.5. Efecto de la rigidez estructural

Empíricamente se encuentra que la fluorescencia se ve particularmente favorecida en moléculas que poseen estructuras rígidas. Por ejemplo, las eficacias cuánticas para el fluoreno y el bifenilo son próximas a 1,0 y 0,2, respectivamente, bajo condiciones de medida similares. La diferencia en el comportamiento parece ser, en gran medida, el resultado de un aumento en la rigidez proporcionado por el puente que forma el grupo metileno en el fluoreno (figura 6.3).

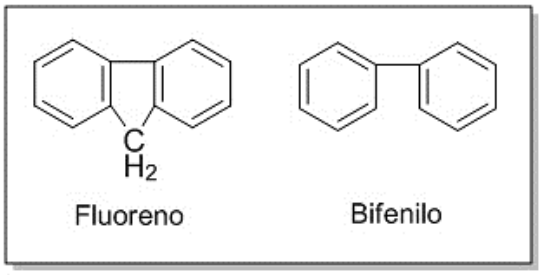


Figura 6.3. Efecto de la rigidez estructural en la fluorescencia

También se ha recurrido a la influencia de la rigidez estructural para explicar el aumento de la fluorescencia de ciertos agentes quelantes orgánicos cuando están formando un complejo con un ion metálico. Por ejemplo, la intensidad de fluorescencia de la 8-hidroxiquinolina es mucho menor que la de su complejo con cinc (figura 6.4).

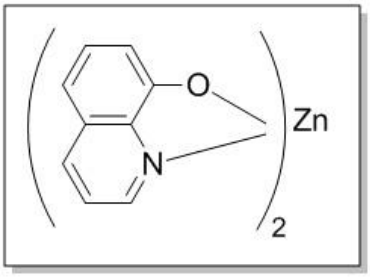


Figura 6.4. Complejo de la 8-hidroxiquinolina con el Cinc.

La falta de rigidez de una molécula probablemente provoca un aumento de la velocidad de conversión interna (K_{CI} en la Ecuación 7.1) y el correspondiente aumento en la probabilidad de desactivación no radiante. Una parte de una molécula no rígida puede sufrir vibraciones de baja frecuencia respecto a sus otras partes y tales movimientos indudablemente explican ciertas pérdidas de energía.

6.2.6. Efectos de la temperatura y del disolvente

La eficacia cuántica de fluorescencia disminuye en la mayoría de las moléculas al aumentar la temperatura, ya que al aumentar la frecuencia de las colisiones cuando la temperatura es elevada aumenta la probabilidad de desactivación por conversión externa. Una disminución en la viscosidad del disolvente también aumenta la probabilidad de la conversión externa y conduce al mismo resultado.

La fluorescencia de una molécula se reduce en presencia de disolventes que contienen átomos pesados o de solutos con dichos átomos en su estructura; como por ejemplo, el tetrabromuro de carbono y el yoduro de etilo.

6.2.7. Efecto del pH en la fluorescencia

La fluorescencia de un compuesto aromático con sustituyentes ácidos o básicos en el anillo depende normalmente del pH. Tanto la longitud de onda como la intensidad de emisión son, probablemente, diferentes para las formas ionizada y no ionizada del compuesto. La tabla 7.1 ilustra este efecto con datos para el fenol y la anilina. Los cambios en la emisión de los compuestos de este tipo surgen del distinto número de especies resonantes asociadas con las formas acidas y básicas de las moléculas. Por ejemplo, la anilina tiene varias formas resonantes mientras que el ion anilinio sólo una (figura 6.5).

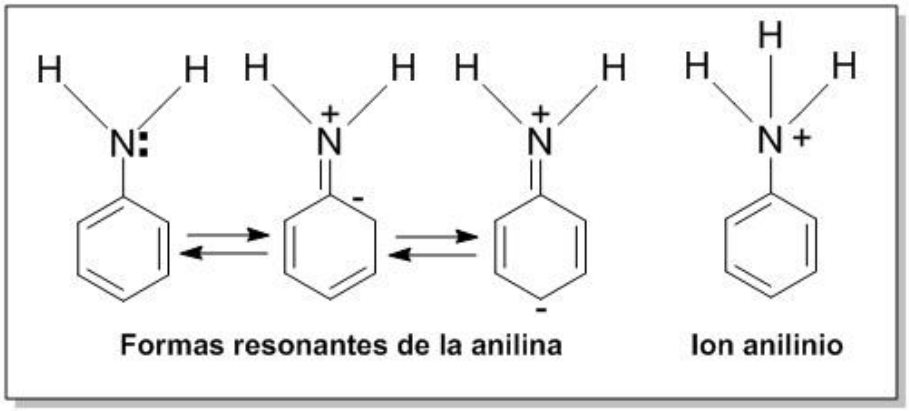


Figura 6.5. Efecto del pH en la fluorescencia.

Cuanto mayor es el número de formas resonantes, mayor es la estabilidad del primer estado excitado y la consecuencia es una fluorescencia en la región ultravioleta.

Estas observaciones sugieren que los procedimientos analíticos basados en las medidas de fluorescencia frecuentemente requieren un control minucioso del pH.

6.2.8. Efecto del oxígeno disuelto

La presencia de oxígeno disuelto suele reducir la intensidad de fluorescencia de una disolución. Este efecto puede ser el resultado de una oxidación de las especies fluorescentes inducida fotoquímicamente. Sin embargo, con más frecuencia la amortiguación tiene lugar como consecuencia de las propiedades paramagnéticas del oxígeno molecular, que favorecen el cruce entre sistemas y la conversión de Las moléculas excitadas al estado triplete. Otras especies paramagnéticas también tienden a amortiguar la fluorescencia.

6.2.9. Efecto de la concentración en la intensidad de fluorescencia

La relación de la potencia de la emisión fluorescente F con la concentración puede escribirse según:

$F = Kc$

Así, la representación gráfica de la potencia fluorescente de una disolución frente a la concentración de las especies emisoras debería ser lineal a bajas concentraciones. Cuando la concentración es tan elevada que la absorbancia es mayor que aproximadamente 0,05, ocurren desviaciones y la linealidad se pierde; entonces F toma un valor inferior al obtenido en la extrapolación de la línea recta de la representación gráfica.

Otros dos factores, responsables también de las desviaciones negativas de la linealidad a elevadas concentraciones, son la autoamortiguación y la autoabsorción.

El primero es el resultado de colisiones entre moléculas excitadas. La transferencia de energía por vía no radiante sucede, quizás, de una manera análoga, a como ocurre la transferencia de energía a las moléculas del disolvente

en una conversión externa. Se puede esperar que la autoamortiguación aumente con la concentración debido a la mayor probabilidad de que tengan lugar colisiones.

Por su parte, la autoabsorción tiene lugar cuando la longitud de onda de emisión se solapa con un pico de absorción; la fluorescencia, entonces, disminuye porque la radiación emitida atraviesa la disolución y es reabsorbida por otras moléculas fluorescentes.

Los efectos de estos fenómenos son tales que pueden hacer que aparezca un máximo en la representación gráfica de la potencia fluorescente frente a la concentración.

Es por ello que es necesario el control de la concentración con vistas a garantizar la relación lineal entre esta y la emisión de fluorescencia.

6.3. INSTRUMENTOS PARA LA MEDIDA DE LA FLUORESCENCIA

Los distintos componentes de los instrumentos para la medida de la fotoluminiscencia son similares a los que se encuentran en los fotómetros o espectrofotómetros ultravioleta-visibles. La figura 6.6 muestra una configuración característica de estos componentes en los fluorómetros y los espectrofluorímetros.

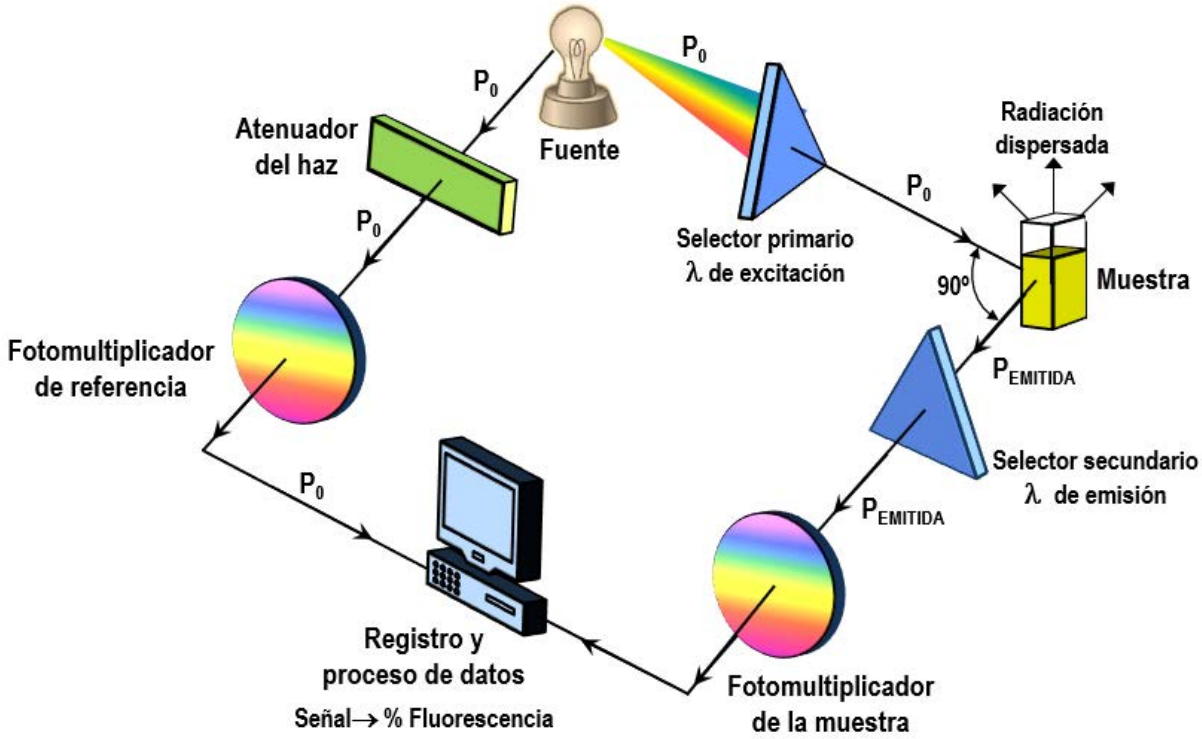


Figura 6.6. Componentes de un fluorómetro o un espectrofluorímetro.

Casi todos los instrumentos de fluorescencia utilizan ópticas de doble haz tal como se muestra en la figura 6.6, para compensar las fluctuaciones en la potencia de la fuente. El haz de la muestra pasa primero a través de un filtro o

un monocromador de excitación, que transmite la radiación que provocará la fluorescencia pero excluye o limita la radiación de la longitud de onda de la emisión fluorescente. La fluorescencia se propaga desde la muestra en todas las direcciones pero lo más conveniente es observar la que forma un ángulo recto (90º) con el haz de excitación; a otros ángulos, la dispersión producida en la disolución y en las paredes de las cubetas aumenta y se pueden cometer grandes errores en la medida de la intensidad. La radiación emitida llega a un fotodetector después de haber pasado por un segundo filtro o monocromador que aísla la longitud de onda máxima de fluorescencia para su medida.

El haz de referencia pasa a través de un atenuador que reduce su potencia a aproximadamente la de la radiación fluorescente (normalmente la potencia se reduce en un factor de 100 o más). Las señales procedentes del fotomultiplicador de la muestra y del de referencia se dirigen a un amplificador diferencial cuya salida se visualiza en un medidor o en un registro. Algunos instrumentos de fluorescencia son de tipo nulo; esta condición se consigue con atenuadores ópticos o eléctricos. Los instrumentos más modernos utilizan un circuito divisor analógico o un sistema de adquisición de datos digital seguido del tratamiento de los datos para obtener la relación entre la intensidad de la emisión fluorescente y la intensidad de la fuente de radiación.

Los verdaderos espectrofluorímetros son instrumentos especializados equipados con dos monocromadores; uno de ellos permite fijar la longitud de onda de excitación y el otro permite variar la longitud de onda de emisión para obtener un espectro de fluorescencia.

6.3.1. Componentes de los fluorómetros y de los espectrofluorímetros

Los componentes de los fluorómetros y de los espectrofluorímetros difieren sólo en detalles de los que componen los fotómetros y los espectrofotómetros UV-vis, por lo que sólo es necesario considerar estas diferencias.

Fuentes

En la mayoría de las aplicaciones se necesitan fuentes más intensas que las lámparas de wolframio o deuterio utilizadas en las medidas de absorción. De hecho, la magnitud de la señal de salida y, por tanto, la sensibilidad, es directamente proporcional a la potencia de la fuente P_0.

Lámparas.

La lámpara más común para los fluorómetros de filtro es la lámpara de arco de mercurio a baja presión equipada con una ventana de sílice fundida. Esta fuente emite líneas útiles para producir la excitación previa a la fluorescencia a 254, 302, 313, 546, 578, 691 y 773 nm. Las líneas individuales se pueden aislar con filtros de interferencia o absorción adecuados. Ya que, en la mayoría de los compuestos fluorescentes, la fluorescencia se puede inducir con distintas longitudes de onda, al menos una de las líneas del mercurio suele resultar adecuada.

Para los espectrofluorímetros, en donde se requiere una fuente de radiación continua, normalmente se utiliza una lámpara de arco de xenón de alta presión, de 75 a 450 W. Estas lámparas requieren una fuente de alimentación potente, capaz de producir corrientes continuas de 5 a 20 A y de 15 a 30 V. El espectro de una lámpara de arco de xenón es continuo desde aproximadamente 300 a 1300 nm. En algunos instrumentos, se obtienen destellos espaciados regularmente en el tiempo mediante la descarga de un condensador a través de la lámpara a frecuencia constante; de esta manera se producen impulsos de luz de gran intensidad. Además, las señales de Salida de los detectores son, así, señales de corriente alterna, que pueden ser fácilmente amplificadas y procesadas.

Filtros y monocromadores

Tanto los filtros de interferencia como los de absorción se han utilizado en los fluorómetros para la selección de la longitud de onda del haz de excitación y de la radiación fluorescente resultante. La mayoría de los espectrofluorímetros están equipados con al menos uno y a veces dos monocromadores de red.

Detectores

La señal de fluorescencia típica es de baja intensidad, por ello, para su medida se necesitan ganancias de amplificador elevadas. Los tubos fotomultiplicadores son los detectores más utilizados en instrumentos de fluorescencia sensibles. Suelen trabajar en la modalidad de recuento de fotones para mejorar la relación señal/ruido. También se utiliza, a veces, la refrigeración de los detectores para mejorar la relación señal/ruido. También se han propuesto, para los espectrofluorímetros, los detectores de diodos en serie y de transferencia de carga. Este tipo de detectores permite el registro rápido de los espectros de excitación y de emisión y particularmente son útiles en cromatografía y en electroforesis.

Cubetas y compartimentos para las cubetas

Para medidas de fluorescencia se utilizan tanto cubetas cilíndricas como rectangulares, fabricadas con vidrio o con sílice. Se debe tener cuidado en el diseño del compartimento de la cubeta para reducir la cantidad de radiación dispersada que llega hasta el detector. Con este propósito, a menudo, se introducen deflectores en el compartimento, incluso más importante que en las medidas de absorbancia, es evitar dejar las huellas dactilares en las cubetas, ya que la grasa de la piel con frecuencia fluoresce.

6.4. APLICACIONES DE LOS MÉTODOS FLUORESCENTES

Es inherente a los métodos fluorescentes el ser aplicables a intervalos de concentración más bajos que las medidas espectrofotométricas de absorción y se encuentran entre las técnicas analíticas más sensibles de las que puedan disponer los científicos. El aumento de sensibilidad surge del hecho de que el parámetro relacionado con la concentración en fluorimetría F se puede medir independientemente de la potencia de la fuente P_0. Por el contrario, una medida

de absorbancia requiere la evaluación de P_0 y de P, ya que la absorbancia, que es proporcional a la concentración, depende de la relación entre estas dos cantidades. La sensibilidad de un método fluorimétrico puede mejorarse aumentando P_0 o mediante la amplificación adicional de la señal de fluorescencia. Por el contrario, en espectrofotometría, un aumento en P_0 da lugar a un cambio proporcional en P y, por ello, no afecta a la absorbancia. Por tanto, los métodos fluorimétricos tienen, generalmente, sensibilidades que son de uno a tres órdenes de magnitud superiores a los correspondientes de absorción. Por otro lado, la precisión y la exactitud de los métodos fluorescentes son habitualmente más pobres que las de los procedimientos espectrofotométricos en un factor entre dos y cinco.

Análisis cualitativo

El análisis cualitativo se realiza a través de los espectros de fluorescencia, los cuales se obtienen realizando la excitación a una longitud de onda fija mientras se varía selectivamente la longitud de onda de emisión; se registra entonces la intensidad de emisión en función de la longitud de onda.

Varios compuestos de importancia en los alimentos experimentan el fenómeno de fluorescencia, ya sea en su estado nativo o como resultado de una reacción de derivatización. Tal es el caso de las vitaminas, los colorantes, los plaguicidas y sustancias tóxicas como las aflatoxinas. Así mismo, varias combinaciones aromáticas consideradas carcinogénicas, como los derivados del 3, 4 benzopireno, muestran fuerte fluorescencia y su presencia puede ser detectada por métodos fluorimétricos.

Análisis cuantitativo

Los métodos más empleados para el análisis cuantitativo son las curvas de calibración (ver epígrafe 3.7.2.2), el método del patrón externo (ver epígrafe 3.7.2.1) y el método de adición de patrón (ver epígrafe 4.5.3).

En la tabla 6.2, se relacionan algunas aplicaciones cuantitativas de la fluorometría en el análisis de alimentos

Tabla 6.2. Algunas aplicaciones de la fluorometría en el análisis cuantitativo.

Sustancia		Condiciones	λ excitación	λ emisión
Vitaminas	A	Estado nativo Extracción con n-butanol	340 nm	490 nm
	B_1 (Tiamina)	Oxidación a Tiocromo con ferrocianuro	365 nm	435 nm
	B_2 (Riboflavina)	Estado nativo (pH= 7)	450 nm	545 nm
	B_6 (Piridoxina)	Estado nativo (pH= 6,75)	340 nm	400 nm
	B_{12} (Cianocobalamina)	Hidrólisis ácida Disolución en HAc 0,1 mol/L	285 nm	380 nm

Sustancia		Condiciones	λ excitación	λ emisión
Pesticidas	Guthión	Hidrólisis	400 nm	455 nm
	Malvín	HCl, $NaNO_2$	366 nm	490 nm
	Potasan	Metanol	320 nm	385 nm

Trabajo Independiente

1. *Consulte los apéndices B-2, B-3, B-4, B-5 y B-6, en los que aparece un resumen del presente capítulo. Céntrese en la comparación de los métodos ópticos de absorción y emisión estudiados hasta el momento.*
2. *Resuelva el ejercicio 6 que aparece en el* ***Capítulo 14 / epígrafe 14.1. Ejercicios propuestos****.*

BIBLIOGRAFÍA

1. Bermejo, R; Moreno, A. (2014). Análisis Instrumental. Editorial Síntesis S. A. Madrid.
2. Cano, B. (2018). Guía de laboratorio de Análisis Instrumental. Corporación Universitaria Rafael Núñez.
3. Fernández, L; Rojas, L; Lapo, B. (2015). Desarrollos experimentales en Análisis Instrumental. Ediciones UTMACH.
4. Rubinson, K & Rubinson, J. (2001). Análisis Instrumental. Pearson Educación SA. Madrid.
5. Rubinson, K y Rubinson, J. (2001). Análisis Instrumental. Pearson Educación S.A. Madrid.
6. Sayago, A; Hernanz, D; Gallo, V; Beltrán, R. (2011). Adaptación de las prácticas de Análisis Instrumental al Espacio de Convergencia Europeo. Elaboración de Material Didáctico. Formación Universitaria – Vol. 4 Nº 1.
7. Sierra, M; Gómez, S; Morante, S; Pérez, D; Sanchez, A; Gañan, J. (2015). Análisis Instrumental. Experiencia de Innovación Docente en la URJC. Ed. Dykinson. Madrid.
8. Skoog, D; Holler, F y Nieman, T. (2001). Principios de Análisis Instrumental. Quinta edición. McGraw-Hill/Interamericana de España, S.A.U.
9. Skoog, D; Holler, J; Crouch, S. (2008). Principios de análisis instrumental. 6ta ed. Cengage Learning Editores

7 Refractometría y Polarimetría

La refractometría y la polarimetría constituyen métodos ópticos que si bien son importantes y presentan algunas aplicaciones de interés en el campo del análisis de los alimentos, su empleo en la práctica es menos habitual que los métodos espectrométricos.

Los principios más generales de los fenómenos de refracción y polarización de la radiación ya fueron tratados en el capítulo 2, epígrafes 2.3.3 y 2.3.4 de este texto. A continuación se abordarán brevemente las características generales de los métodos refractométricos y polarimétricos, así como sus aplicaciones más importantes.

7.1. REFRACTOMETRÍA

La luz viaja a diferentes velocidades a través de medios distintos y, cuando un rayo de luz cruza la interfaz entre dos sustancias, cambia de dirección. El rayo emergente se conoce como rayo refractado y el fenómeno se denomina refracción (ver figura 2.7, epígrafe 2.3.3. capítulo 2).

El índice de refracción (η) de una sustancia es una medida de la velocidad de la luz a través de la sustancia y se define como la razón entre la velocidad de la luz en la sustancia y la velocidad de la luz en el vacío. Para fines prácticos, se usa la velocidad de la luz en el aire y no en el vacío, siendo la diferencia muy pequeña (ver epígrafe 2.3.3. capítulo 2).

$$\text{Índice de refracción de una sustancia determinada } (\eta) = \frac{\text{Velocidad de la luz en el vacío}}{\text{Velocidad de la luz en la sustancia}}$$

7.1.1. Variables que afectan las mediciones del índice de refracción

La temperatura, la longitud de onda y la presión son las variables más comunes que pueden controlarse experimentalmente y afectan el índice de refracción.

Temperatura. La temperatura influye en el índice de refracción de un medio principalmente por el cambio en su densidad. Normalmente, un aumento de la temperatura da lugar a una disminución de la densidad y la luz viaja más rápido a través de un medio de densidad más baja. Por lo tanto, el índice de refracción tiende a disminuir al aumentar la temperatura.

De lo anterior se deduce que para realizar mediciones precisas del índice de refracción debe controlarse la temperatura. Para un líquido promedio las fluctuaciones de temperatura deben ser menores de $\pm$ 0,2 ºC si se requiere una precisión de cuatro lugares, y $\pm$ 0,02 ºC para mediciones con cinco cifras.

Longitud de onda. El índice de refracción de un medio transparente disminuye gradualmente al aumentar la longitud de onda; este efecto se conoce con el nombre de dispersión normal.

Los fenómenos de dispersión hacen que sea esencial especificar la longitud de onda empleada cuando se reporta un índice de refracción. La línea D de una lámpara de vapor de sodio (λ= 589 nm) se usa más comúnmente como fuente de radiación en refractometría y el correspondiente índice de refracción se designa η_D (a menudo se indica también la temperatura en ºC por un superíndice, por ejemplo, η_D^{20}). Otras líneas usadas para mediciones del índice de refracción son las líneas C y F de una fuente de hidrógeno (λ= 656 nm y 486 nm, respectivamente) y la línea G del mercurio ((λ= 436 nm).

Presión. El índice de refracción de una sustancia aumenta con la presión debido al consecuente aumento de la densidad. Sin embargo, la variación de la presión atmosférica solo es importante en la medición del índice de refracción en los gases; en las mediciones en líquidos y sólidos su efecto es despreciable.

7.1.2. Instrumentos para medir el índice de refracción

Existen diversos tipos de refractómetros, los cuales pueden clasificarse en instrumentos óptico-mecánicos y los actuales instrumentos digitales que brindan mayor precisión. La figura 7.1 muestra un resumen de la clasificación de los tipos de refractómetros que se abordarán en este texto.

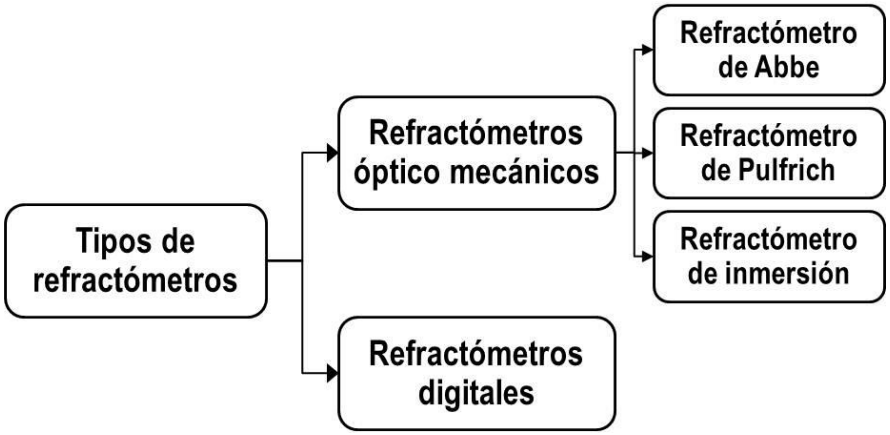


Figura 7.1. Clasificación de los refractómetros

Todos estos refractómetros se basan en el efecto del *ángulo crítico*, que define el punto de equilibrio, el punto de sombra o límite, entre la refracción y el reflejo interno total de la luz en una interface prisma – muestra.

El ángulo crítico es el ángulo formado por la perpendicular a la cual el haz cambia desde la luz transmitida en el líquido a la luz totalmente reflejada en la superficie del líquido. A ángulos más pequeños que el crítico la luz se transmite en el líquido. El ángulo crítico no depende sólo de la composición de la disolución sino del material del prisma (figura 7.2).

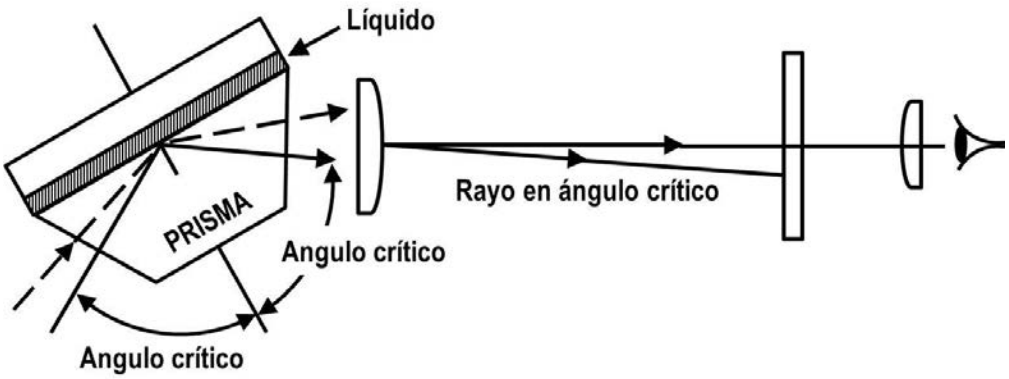


Figura 7.2. Representación esquemática del ángulo crítico

El índice de refracción de la muestra se deriva de la geometría de la vía óptica y del índice de refracción del material del prisma.

El principal hecho destacable de esta técnica es que el índice de refracción se mide en la superficie de la muestra. Como la superficie de reflexión no requiere penetración del rayo en la muestra, este instrumento puede ser usado para muestras bastante opacas y suspensiones además de muestras transparentes.

A continuación se describirán brevemente las características generales de cada tipo de refractómetro.

7.1.2.1. Refractómetros óptico-mecánicos

El principio de medición del índice de refracción es básicamente un sistema óptico que busca medir el ángulo que se ha desviado la radiación, utilizando para ello dos prismas: uno fijo de iluminación sobre el cual se deposita la muestra y uno móvil de refracción. Los prismas están rodeados de una corriente de agua termostatizada, ya que, como se ha planteado con anterioridad, la temperatura es una de las variables que afecta la medida.

El diseño de los refractómetros óptico-mecánicos no ha variado notablemente desde el original planteado por Abbé (1874) y Pulfrich (1887). Se basa en observar el reflejo de la luz a través de una muestra colocada sobre un prisma, la refracción y el reflejo interno total de la luz en la interface (el punto de contacto entre la muestra y el prisma) permite que se genere un punto de sombra que establece el valor del índice de refracción o su equivalente en la escala en la cual se trabaja. Este tipo de instrumento, puede entregar lecturas poco precisas ya que, está sujeta a la apreciación de una persona, es decir, la medición se visualiza por medio ocular obteniéndose el valor cuando el límite hace intersección con la escala.

Refractómetro de Abbe.

Este refractómetro, basado también en el principio del ángulo límite, está ideado para realizar la operación con comodidad y rapidez. Requiere sólo cantidades muy pequeñas de la muestra (apenas unas gotas) y da una precisión del orden de 2 x 10^{-4}. La escala está graduada directamente en índices de refracción para

las líneas D de sodio a 20°C. En su forma usual se puede usar con luz de sodio o con luz blanca. Los modelos de alta precisión se limitan en general al uso de luz de sodio, aunque los fabricantes suministran tablas de corrección para las líneas C y F con una lámpara de hidrógeno.

La figura 7.3 muestra un refractómetro de Abbe comercial con control de temperatura.

Figura 7.3. Refractómetro de Abbe con control de temperatura

En este instrumento, se mantiene una capa fina del líquido que se mide contra la hipotenusa de un prisma de refracción, mediante un prisma auxiliar, cuya hipotenusa está finamente esmerilada. Se ilumina el prisma auxiliar y la luz que se difunde en la superficie esmerilada choca en ángulos diversos sobre el límite entre el líquido y el prisma principal. Esta luz entra en el prisma de refracción en ángulos que varían hasta el ángulo límite. Por consiguiente, cuando se mira con un anteojo la luz que emerge del prisma de refracción, se ve un campo dividido, que se halla en parte oscuro y en parte iluminado con una línea divisoria neta entre las dos porciones.

El procedimiento de lectura del índice de refracción en un refractómetro de Abbe, se observa en la figura 7.4.

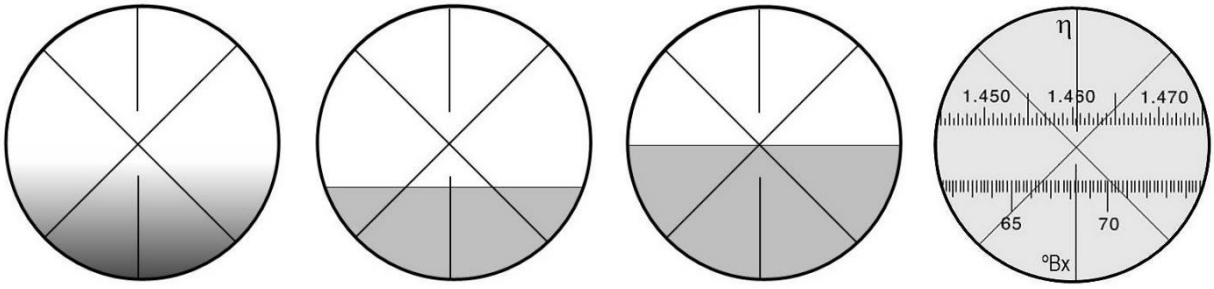


Figura 7.4. Procedimiento de lectura del índice de refracción de una muestra

Luego de aplicar unas gotas de la muestra entre los prismas, se observa por el ocular del equipo y cuando el operador está cerca de índice de refracción de la muestra debe observar que la visión en el ocular demuestra una región oscura en la región inferior y más clara en la superior (figura 7.4a). Accionando entonces un tornillo lateral en el refractómetro, debe buscar una demarcación bien definida entre las regiones claras y oscuras (figura 7.4b) y colocar la frontera exactamente en el centro de los retículos diagonales del ocular (figura 7.4c). Para leer índice de refracción, vea la escala a través del ocular (figura 7.4d). La escala superior indica índice de refracción (η), mientras la inferior indica el porcentaje de sólidos solubles en grados Brix (más adelante, en el epígrafe 7.1.3 será tratada con mayor profundidad la utilidad de esta escala). El ejemplo considerado se obtiene un índice de refracción de 1,4606 y 68,2 grados Brix (figura 7.4d).

El uso de luz blanca, que ordinariamente produce una franja coloreada en vez de un límite oscuro-brillante entre las dos partes del campo, se hace posible con el uso de dos prismas de Amici, para compensar la dispersión relativa del prisma de refracción y de la muestra.

Una ventaja peculiar del refractómetro de Abbe es que en esta forma puede medirse el índice de refracción de muestras opacas, aunque en este caso hay que tener el cuidado especial de evitar películas superficiales que tengan un índice diferente del de la muestra.

Refractómetro de Pulfrich.

El refractómetro de Pulfrich es útil para la medición del índice de refracción de muestras sólidas o líquidas. Con gran cuidado en el uso del instrumento y con los ajustes mejores posibles, se alcanza una precisión del orden de 1×10^{-4} en el índice de refracción. La diferencia del índice entre dos muestras cuyos índices difieren muy poco, se puede determinar con un error de 2×10^{-5}. En la figura 7.5 se muestra uno de los primeros refractómetros de Pulfrich comerciales.

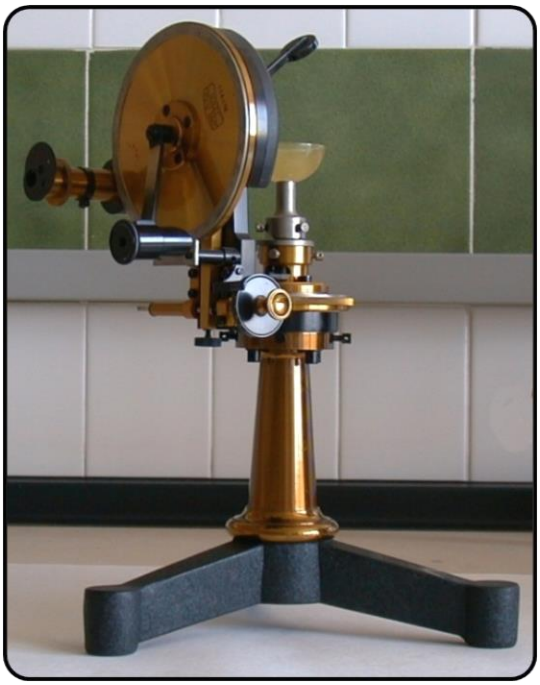


Figura 7.5. Refractómetro de Pulfrich

El componente central de este instrumento es un bloque de vidrio, que ha de ser de excelente calidad, con dos superficies planas formando ángulo recto, una en el plano horizontal y otra en el vertical. La luz, ligeramente convergente, de un foco que da líneas espectrales netas, bien espaciadas, es incidente sobre la superficie horizontal. Los rayos que inciden casi en ángulo de 90º con la normal, esto es,

casi paralelos a la superficie horizontal, se refractan en el bloque Pulfrich en el ángulo límite, lo cual depende del índice de refracción del bloque y del líquido. Si la dispersión del líquido es diferente de la del vidrio, como por lo general es el caso, el ángulo límite será diferente para longitudes de onda distintas. Los rayos que inciden sobre la superficie horizontal en ángulo de menos de 90º con la normal, también se refractan en el bloque. Los rayos incidentes en ángulos mayores que 90º naturalmente no entran en el bloque por la superficie horizontal. Por lo tanto, los rayos refractados en ángulos menores que el ángulo límite, o iguales a esté, emergerán de la cara vertical del bloque de Pulfrich, mientras que no aparecerán los que inciden en ángulos mayores que el crítico.

Refractómetro de inmersión.

El principio del refractómetro de inmersión es el mismo que el de los aparatos de Abbe y Pulfrich. Su nombre proviene del hecho que el prisma de refracción está sujeto rígidamente al objetivo del anteojo y se sumerge en el líquido cuyo índice de refracción se mide. Requiere sólo 10-15 ml de muestra y el prisma simple va montado en un telescopio que contiene el compensador y el ocular. La escala se sitúa debajo del ocular dentro del tubo y la superficie inferior del prisma se sumerge en un pequeño vaso que contiene a la muestra, con un espejo debajo para reflejar la luz hacia arriba a través del líquido.

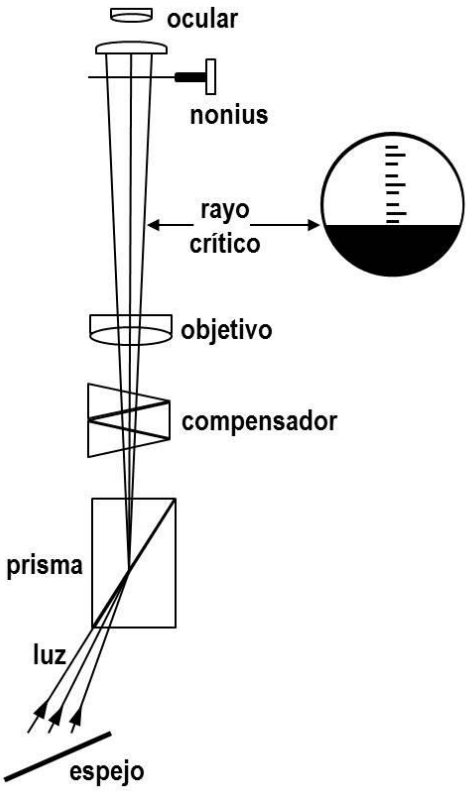


Figura 7.6. Esquema de un refractómetro de inmersión.

Se hace la lectura de la posición de la línea divisoria entre las porciones oscura y brillante del campo sobre una escala en el plano focal del anteojo mientras el prisma está sumergido en el líquido. Las lecturas de la escala se transforman en los índices de refracción correspondientes mediante tablas de conversión suministradas con el instrumento.

La figura 7.6 muestra un esquema de funcionamiento de un refractómetro de inmersión.

El refractómetro de inmersión puede usarse, como el de Abbe, con luz blanca, aunque la compensación de la dispersión se hace por rotación de un solo prisma de Amici, que da un valor algo menos exacto para la dispersión. En algunos instrumentos especiales, ideados para una dispersión estrecha del intervalo del índice, la compensación se hace con un prisma fijo.

El refractómetro de inmersión es muy cómodo para la medición de numerosas muestras que varían poco en el índice de refracción. Su precisión es algo mayor que la del instrumento de Abbe ordinario, pero no es tan adaptable como éste o como el refractómetro de Pulfrich.

La figura 7.7 muestra el diseño de un refractómetro de inmersión moderno con escala para la determinación de humedad en miel de abejas.

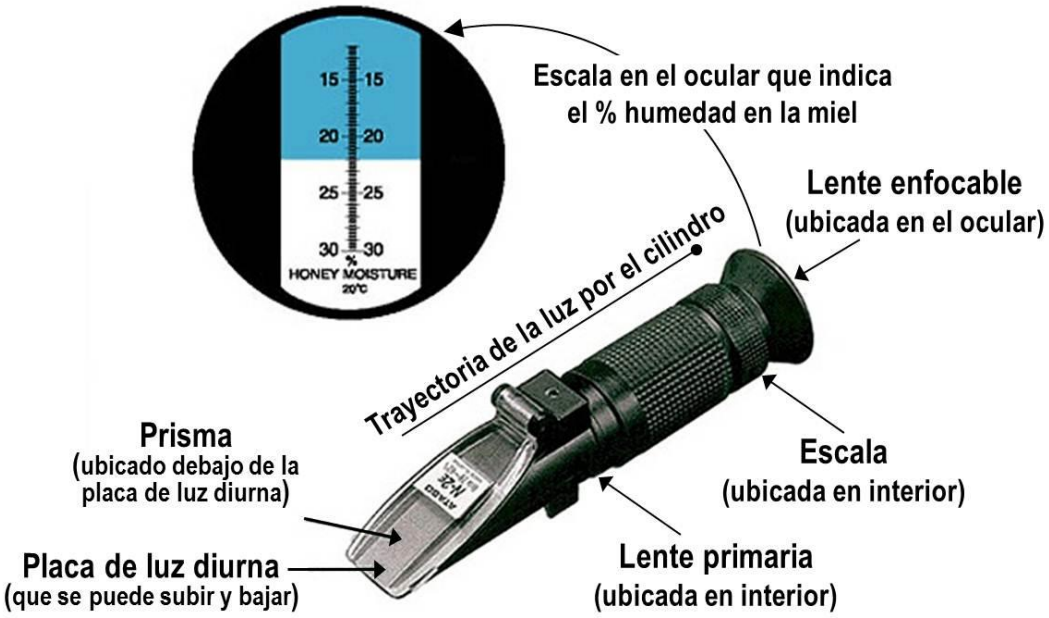


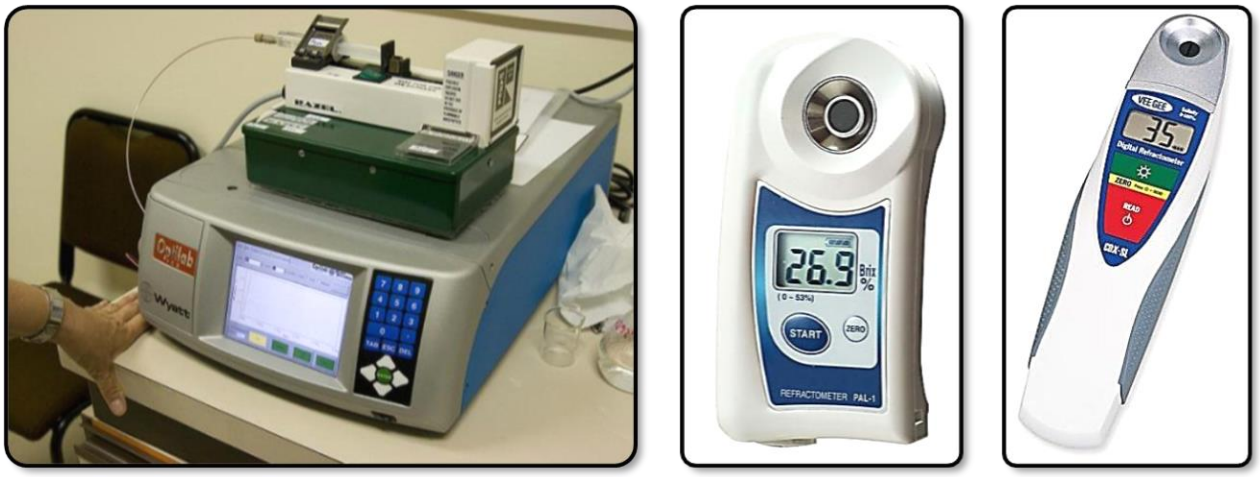
Figura 7.7. Diseño de un refractómetro de inmersión para la medición de humedad en mieles.

7.1.2.2. Refractómetros automáticos digitales

Los refractómetros automáticos digitales usan un circuito integrado de luz (una matriz de diodos) y partes móviles para detectar la posición exacta del límite. La luz, que proviene desde ese circuito integrado, pasa a través de un prisma en contacto con la muestra. Un sensor de imagen determina el ángulo crítico en el cual la luz no es más refractada a través de la muestra. La mayoría de los instrumentos aplican en forma automática la compensación de temperatura a la medición y convierten el índice de refracción de la muestra a una unidad de medida específica. Además, pueden programarse escalas distintas y el resultado se muestra en formato digital, brindando gran simplicidad al proceso y ahorro de tiempo en las conversiones.

Algunos instrumentos también incorporan un programa informático especial para interpretar los límites "difusos" que muchos productos tienden a producir. De esta manera, no se requiere un criterio humano subjetivo al obtener una lectura, lo que constituye la principal ventaja de un instrumento automático.

La figura 7.8 muestra algunos diseños de refractómetros automáticos digitales que se comercializan en la actualidad.



(a) (b) (c)

Figura 7.8. Algunos diseños de refractómetros automáticos digitales: (a) de sobremesa; (b) y (c) portátiles.

7.1.3. Aplicaciones de la refractometría

La refractometría tiene variadas aplicaciones tanto desde el punto de vista cualitativo como cuantitativo.

Cuando la composición de una sustancia cambia, también lo hace su índice de refracción. Así pues, una medida del índice de refracción puede dar información sobre la composición de una sustancia. Por ejemplo, cuando una sustancia se disuelve en un líquido, el índice de refracción aumenta. Así, para determinar la concentración de la solución, puede emplearse una medida del índice de refracción de una solución de azúcar en agua.

Existen numerosos usos y, por lo tanto, los refractómetros se calibran con una o más escalas para adecuarse a las aplicaciones determinadas. En el caso de los instrumentos ópticos, se visualiza una escala por medio del ocular y se obtienen lecturas cuando el límite hace intersección con la escala. En el caso de los instrumentos electrónicos, pueden programarse escalas distintas y el resultado se muestra en formato digital.

El uso de la refractometría en diversos procesos productivos se ha hecho cada vez más necesaria debido a las exigencias en las normativas de calidad vigentes, las cuales incluyen a toda la cadena de producción desde el cultivo de las materias primas, su recepción, elaboración y control de los productos finales en las industrias del rubro químico, agroalimentario y farmacéutico, entre otros.

La medición del índice de refracción en el análisis de los alimentos encuentra aplicaciones en tres áreas fundamentales:

1. Identificar o confirmar la identidad de una muestra comparando su índice de refracción con los valores reportados para esa muestra.

   Un claro ejemplo de esta aplicación es la determinación del índice de

refracción en aceites y grasas comestibles por cuanto esta propiedad física constituye un importante índice de identidad en estos productos, permitiendo corroborar la fuente de obtención de los aceites y grasas, así como posibles adulteraciones del producto final. La tabla 7.1 relaciona los índices de refracción de algunos aceites y grasas comestibles.

Tabla 7.1

Índices de refracción de algunos aceites y grasas comestibles.

Aceites y grasas	**Índice de refracción (η) a 25ºC**
Mantequilla	1,452 – 1,457
Manteca de cacao	1,454 – 1,458
Manteca de cerdo	1,458 – 1,461
Aceite de coco	1,448 – 1,450
Aceite de nuez	1,461 – 1,465
Aceite de maní	1,467 – 1,470
Aceite de maíz	1,470 – 1,474
Aceite de girasol	1,472 – 1,474
Aceite de lino	1,472 – 1,475

2. Determinar la pureza de una muestra comparando su índice de refracción con el valor para la sustancia pura.

   El etanol por ejemplo, posee un índice de refracción de 1,36176, mientras que el metanol muestra un valor de 1,32920. De ahí que la medición de este parámetro sirva para diferenciar ambos alcoholes. De igual modo el índice de refracción puede emplearse para comprobar la pureza de los aditivos alimentarios (colorantes, edulcorantes, potenciadores del sabor, etc.).

3. Determinar la concentración de un soluto en una solución comparando el índice de refracción de la solución con una curva patrón binaria (sal, azúcar, alcohol, etc.).

   Se puede conocer por ejemplo la concentración de metanol contaminante en una muestra de etanol, midiendo el índice de refracción de la mezcla problema y comparándolo con una curva de calibración de una mezcla de metanol y etanol.

   En este caso se prepara una curva de calibrado a partir de etanol (EtOH) y metanol (MeOH) absolutos con concentraciones crecientes y exactamente conocidas del metanol en el rango de concentraciones en que se sospeche la presencia del metanol contaminante, y se lee el índice de refracción de cada una de las mezclas que forman la curva de calibración.

   Supongamos que se preparó una curva con seis concentraciones de metanol entre 0 y 10%, y se obtuvieron los siguientes resultados experimentales:

	Nº de soluciones						Muestra problema
	1	2	3	4	5	6	
% MeOH	0	2	4	6	8	10	¿?
% EtOH	100	98	96	94	92	90	¿?
η	1,36176	1,35941	1,35712	1,35576	1,35311	1,35071	1.35802

El juego de datos de % metanol vs. η, se procesa entonces por regresión lineal obteniéndose los resultados que aparecen en la figura 7.9.

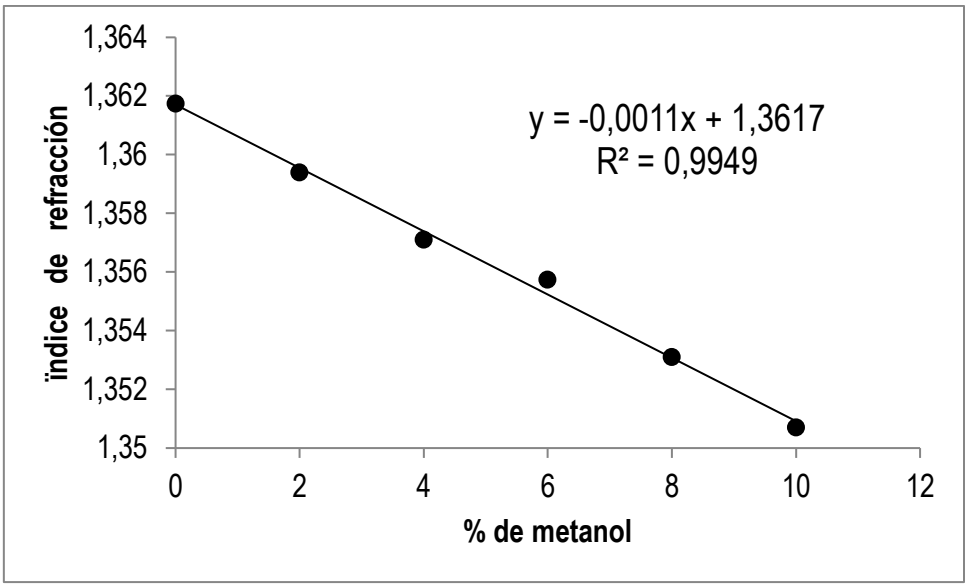


Figura 7.9. Curva de calibración expresada en % de metanol vs. η

Nótese que se obtiene una recta de pendiente negativa, debido a que el índice de refracción del metanol puro es menor que el del etanol; de ahí que en la medida en que se incrementa el % de metanol el índice de refracción de la mezcla disminuye.

En la ecuación de regresión obtenida el término *y* se sustituye por el índice de refracción obtenido para la muestra en estudio y despejando puede calcularse el % de metanol según:

$$\% \ metanol = \frac{1.35802 - 1,3617}{- 0,0011}$$

$$\% \ metanol = 3,34$$

De ahí, que en el ejemplo considerado la solución de etanol está contaminada con un 3,34% de metanol.

Debe señalarse que aun cuando la refractometría puede emplearse para estos fines, en la práctica el contenido de metanol y etanol en bebidas alcohólicas se realiza por cromatografía de gases, por ser un método mucho más potente, exacto, preciso y sensible.

No obstante las aplicaciones antes mencionadas, el uso más extendido de la refractometría en las industrias de alimentos y bebidas está en la medición de los *grados Brix*.

Además de la escala del índice de refracción, la escala de uso más extendido en un refractómetro es la *escala de grados Brix (ºBx)*, que determina el porcentaje de azúcares o sólidos solubles totales y es la más reconocida internacionalmente. Esta escala establece una relación entre la concentración de sacarosa en el agua a 20ºC con el índice de refracción de la solución. La mayoría de los productos alimenticios son más complejos que una solución de sacarosa y muchos otros ingredientes solubles pueden contribuir al índice de refracción total. Sin embargo, la escala de Brix continúa usándose como patrón. En el caso de los productos sin base de sacarosa, el término *"Brix aparente"* es estrictamente más correcto.

El uso de la refractometría ha cobrado gran interés en el área de la fabricación de bebidas y un claro ejemplo está relacionado a la elaboración de vinos. La presencia de azúcares es uno de los parámetros fundamentales de la enología, debido a que esta familia de compuestos interviene prácticamente en todo el proceso de elaboración que conduce desde la uva al vino determinando la calidad del producto final.

Para conocer la concentración de azúcares en los mostos naturales se recurre habitualmente a la determinación del índice de refracción, que posteriormente es transformado a una escala que determina el porcentaje en peso de azúcares o sólidos solubles totales, conocida como grados Brix (°Bx).

Sin embargo, existen otras escalas como los grados Baumé (°Be) y los grados Oechle (°Oe) que también determinan la concentración de estos compuestos en una muestra (1,8°Bx= 1°Be y 0,2°Bx = 1°Oe)

Por otra parte, los dos principales azúcares fermentables presentes en las vacuolas de los granos de uva son la glucosa y la fructuosa (que provienen de la hidrólisis enzimática de la sacarosa durante la asimilación clorofílica) y durante la maduración la concentración de fructuosa se incrementa.

En los granos maduros las concentraciones máximas de ambos azúcares oscilan en el rango de 150 y 350 g/L de jugo, según las cepas; en este estado la relación glucosa/fructosa se encuentra alrededor de 1 y 0,95, mientras que en el vino esta relación debería disminuir considerablemente y estar comprendida entre 0,2 y 0,4. Para controlar esto, se hace necesaria la medición y seguimiento de los azúcares durante todo el proceso fermentativo, generalmente en °Bx o su correspondiente en °Baumé, calculando la relación glucosa/fructosa por medio del equivalente de azucares reductores obtenido de una tabla de comparación. Sin embargo, actualmente existen algunos instrumentos digitales que son capaces de realizar esta conversión de manera automática.

Otro parámetro que puede ser calculado en función de los ºBx obtenidos es el porcentaje de alcohol probable, fundamental para conocer la calidad del producto a obtenerse, de acuerdo a la siguiente ecuación:

Alcohol probable (%) = 0.55 . ºBx

Otras aplicaciones de la refractometría en la industria de alimentos están relacionadas con los productos derivados de frutas y hortalizas, como por ejemplo, en los enlatados de frutas en almíbar se realiza la denominada prueba de corte (cut-out), para determinar la homogeneidad de un lote, midiendo el porcentaje de sólidos solubles totales (°Bx) en el líquido sobrenadante y la pulpa. En el caso de las hortalizas en conserva se determina el porcentaje de cloruro de sodio expresado en °Be (los grados Baumé también pueden ser equivalentes en soluciones de sal siendo la relación de 1°Be = 1% de NaCl) en la salmuera y la hortaliza con el fin de observar si al cabo de 48 horas se ha llegado al equilibrio osmótico deseado, además de ver si el peso neto y el peso escurrido del producto es el correcto para el lote en análisis.

En la elaboración de mermeladas, la refractometría encuentra también una importante aplicación; existen tres parámetros fundamentales para obtener un producto de calidad: la acidez, el porcentaje de azúcar y la concentración del gelificante, en este caso los grados Brix finales deberán encontrarse en el rango de 55–70 °Bx para mantener su vida de anaquel.

Finalmente debe señalarse que en la actualidad la determinación directa para análisis utilizando la refractometría, ha sido superada por la información obtenida por otras técnicas, no obstante, los equipos que miden el índice de refracción son ampliamente utilizados como herramienta de los detectores de muchos aparatos modernos, en particular por la cromatografía líquida de alta resolución, la cual será abordada con detalle en el capítulo 10.

7.2. POLARIMETRÍA

La polarimetría es una técnica instrumental que se basa en la medición de la rotación óptica producida sobre un haz de luz polarizada al pasar por una sustancia ópticamente activa.

La actividad óptica rotatoria de una sustancia, tiene su origen en la asimetría estructural de las moléculas. La causa estructural más simple para que se dé este fenómeno en los compuestos orgánicos, es la existencia de carbonos tetraédricos asimétricos; es decir, unidos a 4 grupos diferentes. Estos carbonos de denominan quirales y provocan que la molécula ópticamente activa presente una imagen especular no superponible (figura 7.10).

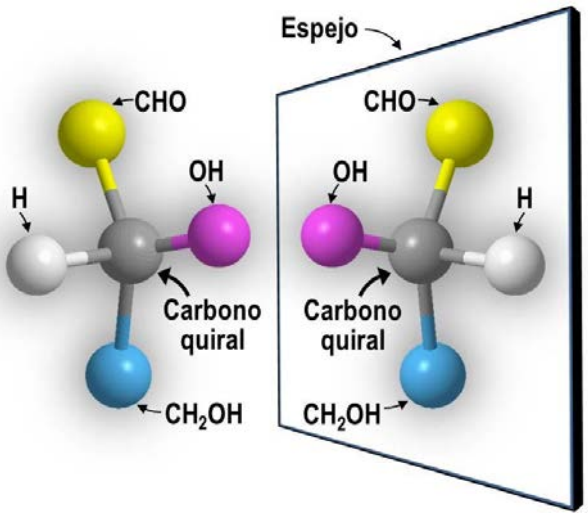


Figura 7.10. Estructura simplificada del D (+) gliceraldehido (a la izquierda de la figura) y su imagen especular no superponible, el L (-) gliceraldehido (a la derecha).

Si bien el fenómeno de la polarización aparece ya descrito en trabajos de Christian Huygens sólo fue estudiado a fondo en el siglo XIX, gracias a las investigaciones de autores como el francés Jean Baptiste Biot (1774-1862) o el alemán Thomas Johann Seebeck (1770-1831). Estos analizaron el comportamiento de disoluciones de ciertas sustancias de origen vegetal y animal. Para confirmar sus experiencias, Biot encargó al constructor de instrumentos Nicolas Fortin (1750-1831) un sencillo aparato que consistía en un prisma analizador y un tubo cilíndrico para introducir la muestra analizada, a través del que pasaba la luz polarizada. De este modo, Biot pudo comprobar que ciertas sustancias de origen natural como "el aceite esencial del laurel" hacían "girar la luz de derecha a izquierda, al igual que la trementina" mientras que, por el contrario, "el aceite esencial del limón y la disolución de alcanfor en alcohol" lo hacían "de izquierda a derecha". Más adelante, las primeras sustancias fueron denominadas "levógiras" y las segundas "dextrógiras". En la figura 7.9, el D (+) gliceraldehido es una molécula dextrógira, mientras que su isómero óptico, el L (-) gliceraldehido, es levógira.

7.2.1. Variables que afectan la rotación óptica

La rotación de la radiación polarizada en un plano por compuestos ópticamente activos puede variar desde varios cientos de grados hasta unas pocas centésimas de grado. Las variables experimentales que influyen en la rotación observada son la longitud de onda de la radiación, la longitud de la trayectoria óptica, la temperatura, la densidad (para el caso de sustancias puras no diluidas) y la concentración para el caso de disoluciones.

Estas variables están expresadas en la llamada ley de Biot, según

$$\alpha = [\alpha]_{\lambda}^{t} \cdot l \cdot c$$

donde:

α es la rotación óptica observada en el equipo (llamada también rotación angular), expresada en grados.

$[\alpha]_{\lambda}^{t}$ es una constante denominada rotación angular específica o rotación específica a una temperatura t en ºC y una longitud de onda determinada.

l es la longitud del tubo del polarímetro en donde está colocada la muestra (longitud del paso óptico) expresada en dm.

C es la concentración del soluto, expresada en gramos por mL de disolución (cuando se trata de líquidos puros, C se sustituye por la densidad)

Rotación angular y rotación angular específica

La rotación angular (α) es una función lineal de la concentración tanto de la sustancia examinada como de la longitud del paso óptico (longitud del tubo). Por lo tanto, al duplicar la concentración se duplicará la rotación angular; al duplicar la longitud del tubo también se duplicará la rotación.

La rotación específica de una sustancia química ($[\alpha]_{\lambda}^{t}$) es una característica única de una sustancia química y se define como la rotación angular α producida por una columna de sustancia de 1 dm de longitud a una concentración de 1g/Ml, manteniendo constantes la temperatura y la longitud de onda. La rotación específica puede ser cualquier ángulo y a menudo tiene una magnitud superior a ± 90°.

Longitud de onda

La longitud de onda del sodio, de 589 nm, es la fuente luminosa más común que se usa en la polarimetría; de ahí que la mayoría de las rotaciones específicas tienen como referencia la longitud de onda del sodio, de 589 nm y los datos publicados se basan en esta longitud de onda. Otras fuentes menos usadas serán comentadas en más adelante en el epígrafe 7.2.2.

De cualquier modo, la rotación específica se representa siempre teniendo en cuenta estos los parámetros de temperatura y longitud de onda, por ejemplo, $[\alpha]_{D}^{20}$ significa que la rotación específica se halló a 20ºC y empleando la línea D de sodio a 589 nm.

El convenio adoptado para para designar la dirección de rotación del plano de polarización, y así el signo de α y $[\alpha]_{\lambda}^{t}$, es el siguiente: cuando el plano de polarización rota en el sentido de las manecillas del reloj, se dice que la sustancia es dextrógira o dextrorotatoria (+), y cuando la rotación se produce en el sentido contrario a las manecillas del reloj se dice que la sustancia es levógira o levorotatoria (−).

7.2.2. Polarímetros

Los polarímetros son instrumentos ópticos para medir la rotación o el "giro" de la luz. Los laboratorios industriales y académicos usan los polarímetros para una

variedad de fines, desde el simple control de calidad hasta la investigación fundamental de estructuras químicas complejas.

En 1828, el fabricante de instrumentos escocés William Nicol (1768-1851) ideó los prismas que acabaron siendo conocidos con su nombre, y se convirtieron, más adelante, en una pieza clave de los polarímetros. Se trataba de dos porciones de espato de Islandia, una variedad incolora de la calcita, unidas por una de sus caras. Un prisma de Nicol permite polarizar la luz en un determinado plano, de modo que, al pasar por un nuevo prisma de Nicol, sólo se observa la intensidad luminosa inicial si éste último se encuentra en la misma posición que el primero. Si entre los dos prismas se coloca una sustancia ópticamente activa, el plano de la luz polarizada girará al pasar a través de esta sustancia y, por lo tanto, el segundo prisma deberá ser colocado en una posición ligeramente diferente al primero para observar luz. La diferencia entre la posición del primero y la del segundo indica el poder rotatorio de la muestra analizada y a partir de este valor se pueden calcular diversas características de la sustancia.

Así, los componentes básicos de un polarímetro son una fuente de radiación monocromática, un prisma polarizador para producir radiación monocromática, un tubo de muestra, un prisma analizador con escala circular y un detector, que en la mayoría de los casos es el ojo humano, aunque en los últimos años han aparecido algunos polarímetros equipados con fotoceldas u otros dispositivos para la medición de la intensidad de la luz que emerge del instrumento. La figura 7.11 muestra el esquema general de un polarímetro.

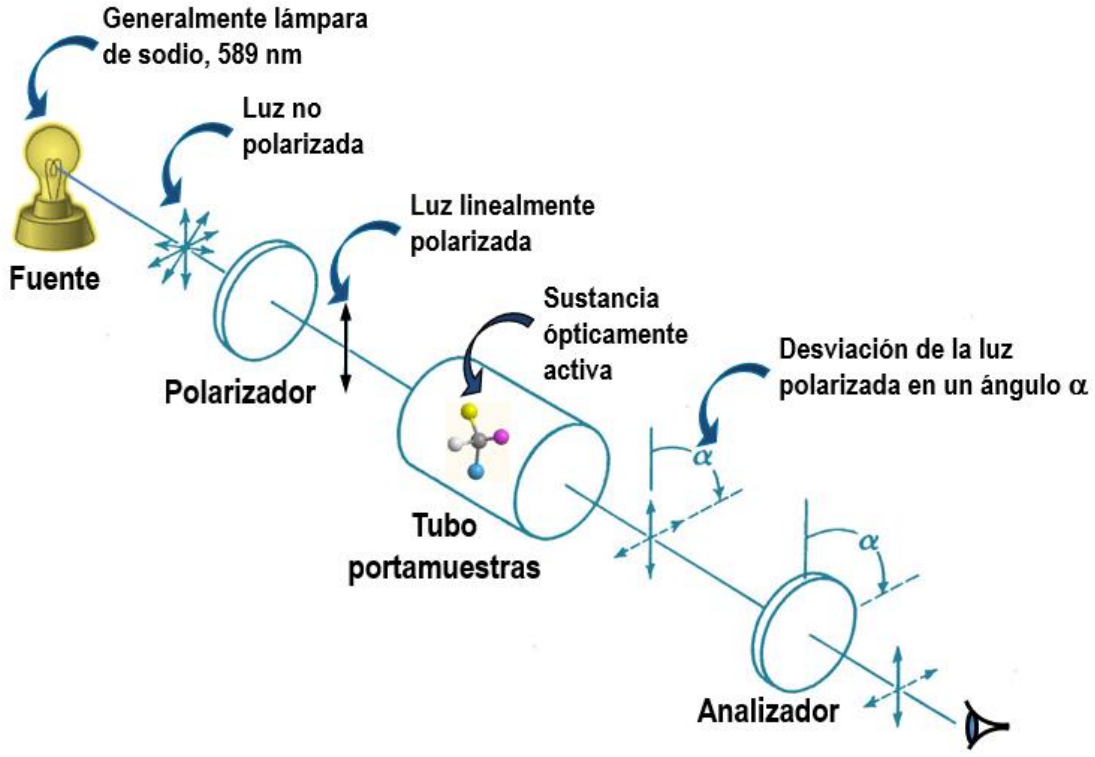


Figura 7.11. Esquema general de un polarímetro

Fuentes. Como la rotación óptica varía con la longitud de onda, se emplea radiación monocromática, generalmente proveniente de una lámpara de vapores de sodio que emiten radiación de longitud de onda a 589 nm. Otra fuente popular es el mercurio, con una longitud de onda de 546 nm; existe cada vez un mayor interés por la longitud de onda del infrarrojo cercano, de 880 nm, debido a su capacidad para penetrar las muestras que absorben muestras oscuras y con colores intensos que absorben luz.

Polarizador y analizador. Por lo general se emplean prismas de Nicol tanto para producir luz polarizada en un plano (polarizador) como para determinar el ángulo con que la muestra hace girar la luz polarizada (analizador). Conjuntamente se utiliza un dispositivo de media sombra que no es más que un pequeño prisma de Nicol, llamado prisma de Lippich.

Los prismas de Lippich no son más que uno o dos prismas polarizadores de pequeño tamaño que se colocan a continuación del prisma polarizador, con su plano de polarización desviado dos o tres grados con respecto a este (figura 7.12), de forma tal que intercepte la mitad (figura 7.12a) o las dos terceras partes del campo visual (figura 7.12b) respectivamente.

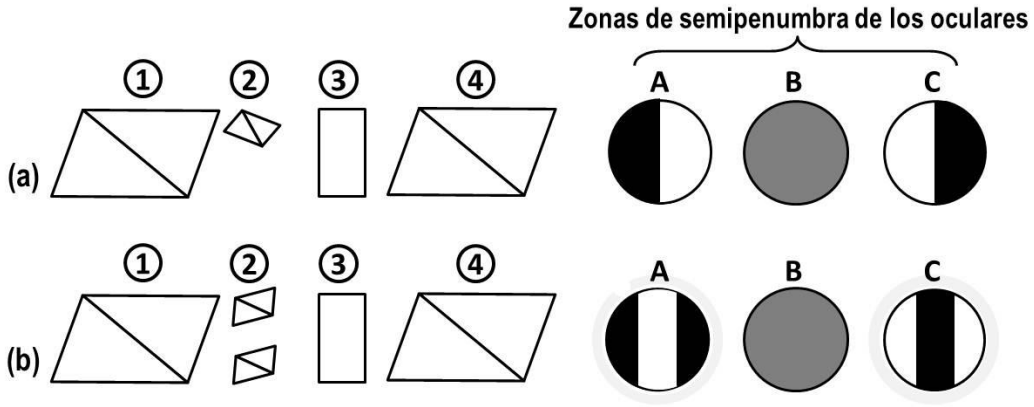


Figura 7.12. Representación esquemática de los sistemas de semipenumbra. (a) con un prisma de Lippich, (b) con dos prismas de Lippich. ① Polarizador, ② Prismas de Lippich, ③ Tubo de muestras, ④ Analizador.

Para realizar las lecturas, el polarímetro se calibra a cero, con agua destilada, para la posición de semipenumbra (figura 7.11, oculares A), luego se introduce la muestra en el tubo y se vuelve a llevar a la posición de semipenumbra (figura 7.11, oculares C); entonces se lee en la escala el valor de rotación angular (α).

Otros dispositivos de punto final que operan basándose en el mismo principio del prisma de Lippich, permiten determinar la potencia rotatoria óptica con una precisión de 0,005 a 0.01 grados en condiciones ideales. Los detectores fotoeléctricos permiten obtener una precisión de 0,001 grado.

Tubos de muestra. La muestra a analizar se coloca en tubos cilíndricos, generalmente de 10 cm de longitud (1 dm). Los extremos son discos de vidrio planos y paralelos que se fusionan a las paredes del tubo o que se mantienen

colocados con tapones enrroscados. Para mediciones precisas los tubos están rodeados de cuna camisa para controlar la temperatura.

Intervalo angular: ambigüedad

Los polarímetros sólo pueden detectar la posición del plano de luz antes de entrar en la muestra y después de transmitirla a través de la muestra. La diferencia angular (rotación) puede proporcionar un resultado ambiguo porque una rotación positiva, por ejemplo, de 110°, es la misma posición del plano que una rotación negativa de -70. Por lo tanto, una muestra con una rotación de +110º mostrará igualmente -70º en el intervalo de grados predeterminado (figura 7.13).

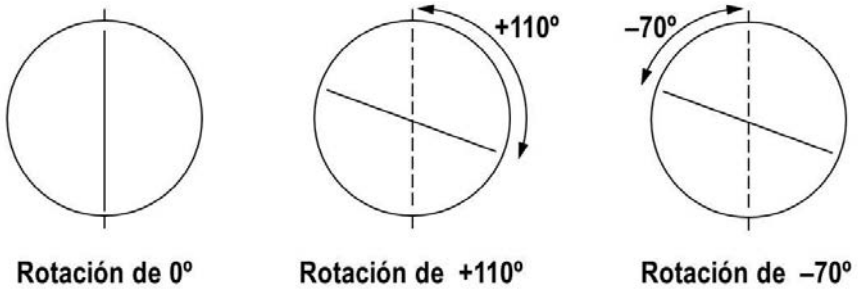


Figura 7.13. Ambigüedad del intervalo angular

El instrumento no puede decidir por sí solo cuántas veces el plano ha pasado por la posición de referencia de 180º a lo largo de la longitud de la vía de la muestra. Depende del usuario conocer el intervalo (segmento angular) en el que se situará el resultado preparar el experimento para establecer la rotación absoluta. Por esta razón, con polarímetros digitales automáticos como el B+S ADP 220, el usuario debe seleccionar el intervalo angular de medición, conociendo (aproximadamente) dónde se situará la lectura.

En el caso de rotaciones angulares grandes (magnitud superior a ±90°), es habitual que el usuario varíe sistemáticamente la concentración (o longitud del tubo) y mida las rotaciones correspondientes. De esta manera, es posible determinar la diferencia entre una rotación de +270º y +90º. Desde luego, con los polarímetros manuales o semiautomáticos, es posible visualizar el círculo completo de ±180°. El resultado continúa siendo ambiguo, pero el usuario puede seleccionar uno de los dos puntos de la escala circular o tambor rotatorio, lo que resulte adecuado. El instrumento no decide cuál es la posición correcta; es el usuario quien lo hace.

Con polarímetros completamente automáticos, es habitual proporcionar una visualización de ±90°. Luego, el usuario debe decidir si continúa experimentando con concentraciones o longitudes del tubo para investigar la magnitud de la rotación. Así pues, cuando se visualiza una lectura de 45º, puede que el usuario deba añadir 180º, sabiendo que la rotación absoluta es de 225º (en este caso, una dilución del quíntuplo continuará dando una lectura de 45º).

La figura 7.14 muestra las imágenes de dos polarímetros manuales convencionales comercializados en la actualidad.

Figura 7.14. Polarímetros manuales convencionales

7.2.2.1. Sacarímetros

Una de las sustancias que concentró mayor atención en la segunda mitad del siglo XIX, por razones médicas e industriales, fue el azúcar, cuyo interés comercial se acrecentó a lo largo del siglo XIX hasta transformarse en un producto de gran importancia económica. Bajo este impulso, se desarrollaron aparatos especialmente adaptados para este objetivo que se denominaron "sacarímetros".

El sacarímetro partió entonces de la base del polarímetro como instrumento destinado a la medición de la cantidad de azúcar en una sustancia. A finales de dicho siglo, estos aparatos fueron utilizados por médicos y farmacéuticos para determinar la presencia de glucosa en la orina y facilitar el diagnóstico de la diabetes, entre otros aspectos.

El principio de funcionamiento de estos sacarímetros es bastante simple. Disponen de un sistema destinado a la medición de la variación del plano de polarización de la luz. Dado que esta variación se puede relacionar fácilmente con la concentración de la sustancia, el aparato puede calibrarse y emplearse para determinar la cantidad de un determinado producto en una muestra de composición desconocida. El sacarímetro tiene la ventaja de utilizar como fuente luz blanca, pero para mejorar las condiciones de la medición se utiliza un filtro de dicromato de potasio con el fin de absorber el color violeta del espectro.

Las aplicaciones fundamentales de los sacarímetros están en la industria del azúcar, y la rotación se expresa sobre una escala diferente, llamada Escala Internacional del Azúcar (ISS en sus siglas inglesas), que se denota como ºZ.

7.2.2.2. Polarímetros automáticos

Los polarímetros automáticos constituyen hoy en día instrumentos analíticos con una gran difusión en el mercado. Mientras los polarímetros manuales han de ser

operados por expertos cualificados y su uso requiere un cierto tiempo, los polarímetros automáticos modernos aceleran dicho proceso, pues proporcionan valores de medición exactos en tan sólo un segundo. Así pues, se minimizan los errores ocasionados por el operador y la constancia de medición se mejora considerablemente: un factor determinante en las mediciones sistemáticas.

Entre sus características y beneficios se encuentran:

- Extremadamente eficientes en el tiempo; con un tiempos de medición de un segundo.
- Alta precisión y resolución.
- Cómodas pantallas táctiles que permiten realizar la gestión completa de muestras y de usuarios en el aparato mismo. Igualmente, trae incorporado un sistema integrado de bases de datos SQL para almacenar datos. Los polarímetros pueden estar conectados a una computadora, a través de una interfaz Ethernet, o integrados en una red existente.
- La polarimetría automática es compatible con las Buenas Prácticas de Laboratorio (GLP, por sus siglas en inglés) y la US FDA

Gracias a la velocidad de medición aumentada, se mejora notablemente la productividad en el laboratorio, por lo que invertir en un instrumento automatizado siempre es ventajoso desde el punto de vista económico. De todos modos, la polarimetría manual tiene todavía cabida en laboratorios más pequeños y en los procesos formativos. Sin embargo, para las industrias modernas del sector farmacéutico, químico, azucarero o de procesamiento de alimentos, los polarímetros automáticos son hoy en día, la mejor opción.

La figura 7.15 muestra dos polarímetros automáticos digitales de importantes firmas comercializadoras.

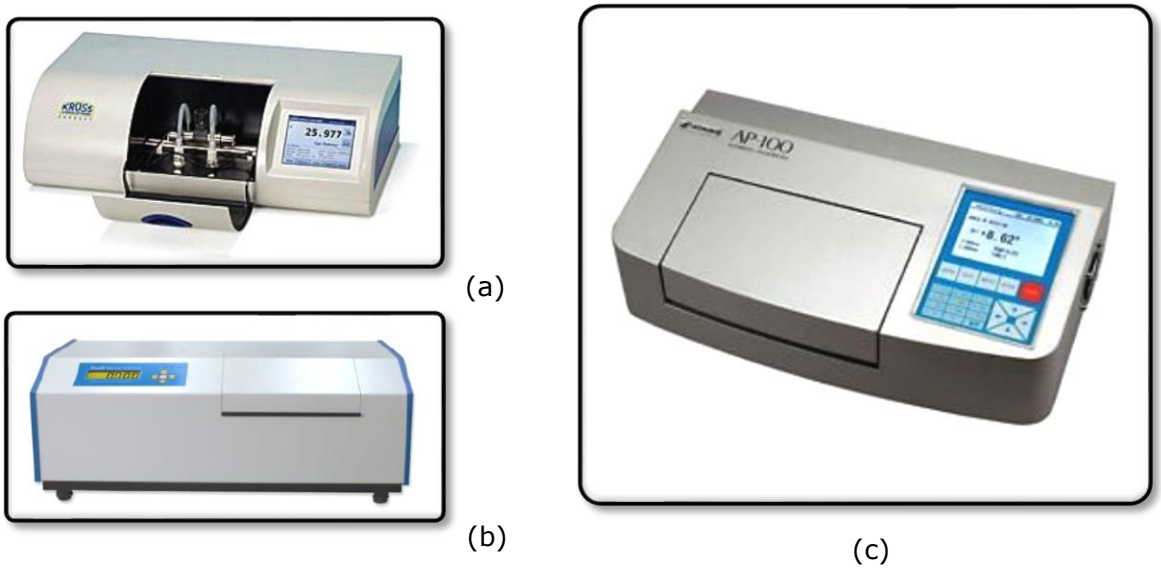


Figura 7.15. Polarímetros automáticos digitales: *(a) Polarímetro automático digital p-8000 de la firma KRUSS, (b) Polarímetro automático digital 412 ZUZI, (c) Polarímetro automático digital AP-300 de la firma ATAGO.*

Una experiencia cubana es el polarímetro LASERPOL 3M, ideado por un grupo de investigadores cubanos del Centro de Desarrollo de Equipos e instrumentos científicos (CEDEIC), para la automatización de los laboratorios de los centrales azucareros.

La introducción del láser como fuente luminosa en los polarímetros de la serie LASERPOL, garantiza una alta monocromaticidad, una elevada intensidad luminosa, mayor transparencia de las soluciones a esta longitud de onda y un tiempo de vida superior a las 20 000 h.

El LASERPOL 3M está especialmente concebido para su aplicación en la industria azucarera al cumplir con las recomendaciones de la ICUMSA (Comisión Internacional para la Uniformidad de los Métodos de Análisis Azucareros). Además, está unido a un software diseñado al efecto que permite la salida de los datos a través del monitor de una computadora y por tanto ofrece un elevado nivel de automatización de las mediciones.

7.2.3. Aplicaciones de la polarimetría

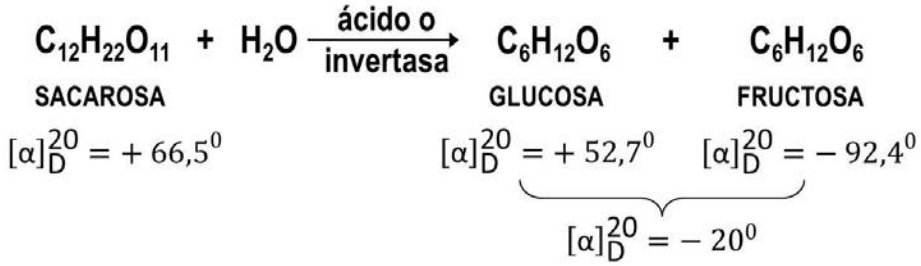
Las mediciones de la rotación óptica pueden emplearse para determinar la concentración y/o la pureza de una sustancia, o simplemente para detectar la presencia de una sustancia química ópticamente activa en una mezcla.

La rotación angular específica ($[\alpha]_{\lambda}^{t}$) de un compuesto bajo condiciones especificadas proporciona una constante física útil para fines de identificación semejante al punto de fusión, al punto de ebullición o al índice de refracción. La actividad óptica es característica de muchas sustancias naturales presentes en los alimentos, como aminoácidos, esteroides, alcaloides y carbohidratos; la polarimetría representa un valioso método para la identificación de estos compuestos.

En el análisis cuantitativo también se emplea la polarimetría para la cuantificación de compuestos ópticamente activos. Se emplean curvas de calibración empíricas que relacionan la rotación angular (α) con la concentración. Estas gráficas pueden ser lineales, hiperbólicas o parabólicas.

Pero sin dudas, la aplicación fundamental de la polarimetría en el análisis de los alimentos está en la determinación de azúcares. Por ejemplo si se desea cuantificar la sacarosa en una muestra donde este disacárido es el único constituyente ópticamente activo, la determinación se realiza mediante un sencillo análisis polarimétrico de una solución acuosa de la muestra, ya que la concentración es directamente proporcional a la rotación angular (α) medida.

Ahora bien, si en la muestra están presentes otras sustancias ópticamente activas se requiere de un procedimiento más complejo. En este caso se determina el cambio en la rotación como consecuencia de la hidrólisis de la sacarosa, ya sea ácida o enzimática por acción de la enzima invertasa. La base de este análisis se representa por la siguiente reacción:



Esta reacción se denomina inversión debido a que la mezcla de glucosa y fructosa resultante de la hidrólisis de la sacarosa posee una rotación invertida (levorrotatoria, $[\alpha]_D^{20}$= – 20º), con respecto al poder rotatorio de la sacarosa nativa (dextrorrotatoria, $[\alpha]_D^{20}$= + 66,5º). En este caso la concentración de sacarosa es directamente proporcional a la diferencia de la rotación angular (α), antes y después de la inversión.

La mezcla de glucosa y fructosa resultante de la hidrólisis de la sacarosa, se conoce como *"azúcar invertido"* y tiene una gran importancia en la industria de los alimentos debido a que su poder edulcorante (dulzor) es superior al de la sacarosa, y se emplea ampliamente en productos de repostería, panadería, confitería y jarabes entre otras golosinas y productos horneados.

Otra propiedad importante del azúcar invertido es su propiedad de retardar el proceso de cristalización, por lo que también tiene amplias aplicaciones en la elaboración de helados. En este caso, su aplicación en heladería es similar a la del uso de la dextrosa, glucosas (jarabe o en polvo), y del jarabe de maíz de alta fructosa (JMAF). Todos estos azúcares cumplen la función de inhibir la recristalización de la sacarosa y eventualmente de la lactosa. Al ser incristalizable permite que se mantenga maleable el helado, además ayuda en la formación de cristales de hielo pequeños por lo que se consigue una textura suave y más agradable y refinada.

La polarimetría también puede ser utilizada en la determinación de glucosa y de maltosa en el almidón de papa utilizando la rotación óptica y la valoración con yodo; así mismo puede emplearse en la determinación del grado de oxidación de almidones modificados, los cuales se usan como aditivos en la industria alimentaria.

Otras aplicaciones que pueden citarse son la determinación de lactosa en leches, la determinación de almidón en varios alimentos, la determinación de glucógeno en productos cárnicos, la determinación de azúcar invertido y la estimación de los contenidos relativos de glucosa y fructosa en mostos, vinos dulces y mistelas, mediante el establecimiento de la relación entre azúcares reductores y desviación polarimétrica a 20°C, entre otra muchas aplicaciones.

Debe señalarse que en caso de la determinación del perfil de monosacáridos y disacáridos en alimentos se realiza hoy en día por otros métodos más potentes como la cromatografía líquida de alta resolución, la cual será abordada en al capítulo 10.

Trabajo Independiente

1. *Consulte el apéndice B-7, en el que aparece un resumen del presente capítulo.*
2. *Resuelva los ejercicios 7 y 8 que aparecen en el* ***Capítulo 14 / epígrafe 14.1. Ejercicios propuestos****.*

BIBLIOGRAFÍA.

1. Bermejo, R; Moreno, A. (2014). Análisis Instrumental. Editorial Síntesis S. A. Madrid.
2. Cabrera, A. y Lines, G. (1985). Análisis Instrumental. Métodos ópticos. Tomo I. Ed. Pueblo y Educación, La Habana. Cuba.
3. Cano, B. (2018). Guía de laboratorio de Análisis Instrumental. Corporación Universitaria Rafael Núñez.
4. Fernández, L; Rojas, L; Lapo, B. (2015). Desarrollos experimentales en Análisis Instrumental. Ediciones UTMACH.
5. Hernández, A. (1995). Análisis Químico Cuantitativo. Ed. Felix Varela. La Habana.
6. McLeod, J. A. (1973). Instrumental Methods of Food Analysis. Elek Science. London.
7. Rubinson, K & Rubinson, J. (2001). Análisis Instrumental. Pearson Educación SA. Madrid.
8. Sayago, A; Hernanz, D; Gallo, V; Beltrán, R. (2011). Adaptación de las prácticas de Análisis Instrumental al Espacio de Convergencia Europeo. Elaboración de Material Didáctico. Formación Universitaria – Vol. 4 Nº 1.
9. Sierra, M; Gómez, S; Morante, S; Pérez, D; Sanchez, A; Gañan, J. (2015). Análisis Instrumental. Experiencia de Innovación Docente en la URJC. Ed. Dykinson. Madrid.
10. Skoog, D; Holler, J; Crouch, S. (2008). Principios de análisis instrumental. 6ta ed. Cengage Learning Editores

8 Introducción a los métodos cromatográficos

8.1. GENERALIDADES

La separación de los componentes de mezclas complejas de compuestos naturales o sintéticos con vistas a su identificación y cuantificación, ha sido siempre un problema de gran interés para la química analítica. En este sentido el desarrollo se ha ido moviendo desde la aplicación de métodos químicos clásicos hasta el empleo de técnicas instrumentales sofisticadas que aventajan a las primeras en cuanto a rapidez, exactitud, precisión y sensibilidad.

El origen de los métodos cromatográficos se remonta a la segunda mitad del siglo XIX. Los primeros trabajos científicos de separaciones físicas notables fueron reportados por Runge en 1855 y Schonbein en 1861. Estos investigadores aplicaron una mezcla compleja de colorantes en un punto de una hoja de papel de filtro e hicieron llegar a este un solvente, observando que la mancha inicial se expandió radialmente separándose en sus componentes. Aunque estos resultados fueron novedosos transcurrieron 80 años para que resurgiera la cromatografía de papel como hoy se le conoce.

Alrededor de 1892, Redd logró separaciones de compuestos químicos basados en principios físicos. Para ello usó tubos llenos de kaolin en los que separó dicromato de potasio de eosina, así como iones férricos de iones cúpricos. Hoy se conoce este procedimiento como análisis frontal en cromatografía en columna.

Pero el verdadero padre de la cromatografía fue el botánico ruso Mijail Tswett, el cual publicó en 1903 la separación exitosa de varios pigmentos vegetales extraídos de una planta con éter de petróleo, mediante la aplicación del extracto vegetal en un tubo de vidrio relleno con carbonato de calcio. Tswett observó que una vez aplicado el extracto, al hacer pasar éter de petróleo a través de la columna la banda coloreada inicial se movía a través de esta y comenzaba a separarse en varias bandas igualmente coloreadas. La figura 8.1 ilustra este experimento.

Sin restar mérito a sus predecesores, Tswett no solo logró la separación de los pigmentos vegetales, sino que, por las bandas coloreadas obtenidas, fue el primero en acuñar el término "cromatografía" (del griego "*croma atos*" que significa color y "*graphos*" que se refiere a escritura). Además, con gran visión científica, no excluyó la posibilidad de que el método fuera aplicado también en la separación de compuestos incoloros siempre y cuando se utilizara una técnica de visualización de las zonas correspondientes a cada compuesto.

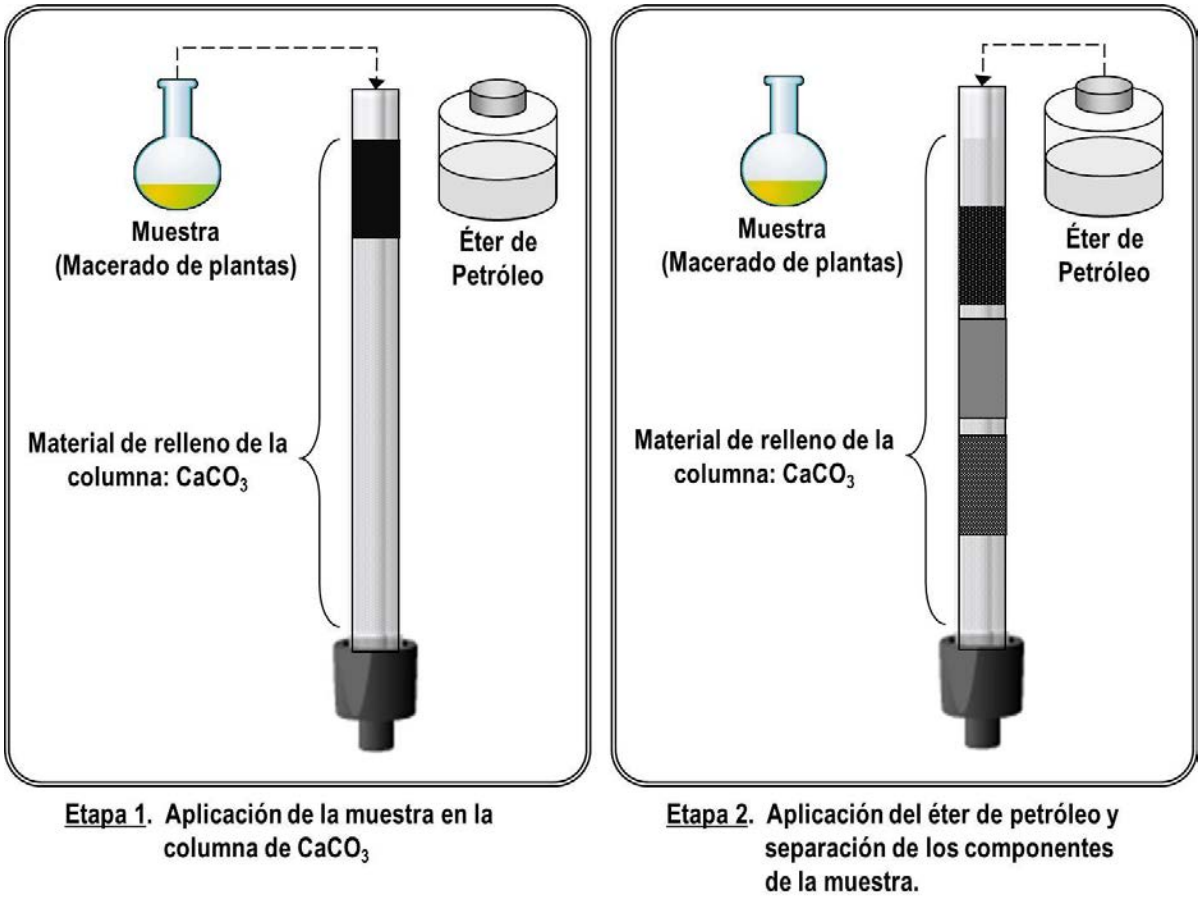


Figura 8.1. Experimento de Mijail Tswett

En la actualidad se mantiene el término de cromatografía, aun cuando la mayoría de las separaciones que se realizan por esta técnica, se aplican a compuestos incoloros.

Así, la cromatografía puede definirse como "*aquel método de separación de los componentes de una mezcla de solutos, basado en las diferentes velocidades con que se mueven cada uno de ellos a través de un lecho estacionario de gran desarrollo superficial (fase estacionaria) mientras son arrastrados por un fluido en movimiento (fase móvil)*".

En el experimento de Tswett, la fase estacionaria es el carbonato de calcio mientras que la fase móvil es el éter de petróleo. Los pigmentos vegetales de la muestra tienen diferencias de afinidad por la fase estacionaria (algunos son más afines que otros), lo que conduce a que se muevan por ella a diferente velocidad mientras son arrastrados por el éter de petróleo (las más afines con la fase estacionaria se moverán más lentamente mientras que las mas solubles en la fase móvil lo harán más rápido); precisamente esa diferencia de velocidad es lo que posibilita la separación de los compuestos.

En 1974 la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC, *del inglés Internacional Union Pure Applied Chemistry*) definió la cromatografía del siguiente modo:

"La cromatografía es un método físico usado principalmente para la separación de los componentes de una muestra, en el cual estos se distribuyen entre dos fases, una de ellas estacionaria mientras que la otra se mueve. La fase estacionaria (FE) puede ser un sólido o un gel y puede estar empacada en una columna, esparcida en forma de capa o distribuida como una película. La fase móvil (FM) puede ser un líquido o un gas".

8.2. CLASIFICACIÓN DE LOS MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS

Los métodos cromatográficos pueden clasificarse en función de diferentes criterios los cuales se describen a continuación.

A. **En función del mecanismo físico químico que rige la separación**. En este sentido los métodos cromatográficos pueden se clasifican en cromatografía de *adsorción*, cromatografía de *reparto*, cromatografía de *intercambio iónico* y cromatografía de *filtración sobre gel.* Más adelante se explicarán con detalle estos cuatro mecanismos.

B. **En función de la disposición de la fase estacionaria**. Así, se define la ***cromatografía en columna*** cuando la separación ocurre en un sistema cerrado (una columna), y la ***cromatografía plana*** cuando la separación ocurre en una superficie plana y abierta (un papel o una capa delgada).

C. **En función del estado de agregación de la fase móvil**. En este caso se habla de la *cromatografía líquida,* cuando la fase móvil es un líquido y la *cromatografía de gases*, cuando la fase móvil es un gas. Si se considera además el estado de agregación de la fase estacionaria, el cual puede ser sólido o líquido, aparecen combinaciones en función de la fase móvil empleada.

   La *cromatografía líquida clásica* utiliza como fase estacionaria un líquido adsorbido por un sólido (cromatografía líquido – líquido, en la que pueden ocurrir los mecanismos de reparto y filtración sobre gel) o un sólido propiamente (cromatografía líquido – sólido, en la que tiene lugar los fenómenos de adsorción o intercambio iónico). En cualquiera de los casos considerados, la fase estacionaria puede estar contenida en una columna o dispuesta sobre una placa.

   La cromatografía líquida en columna evolucionó en su desarrollo hacia la *cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, del inglés High Performance Liquid Chromatography)*, mientras que la cromatografía plana encuentra hoy un gran despliegue en la cromatografía en capa delgada de alta resolución *(HPTLC, del inglés High Performance Thin Layer Chromatography).*

   En *cromatografía de gases*, la fase móvil es un gas que transporta al soluto, que debe encontrarse en estado gaseoso. La técnica más utilizada es la cromatografía de reparto gas-líquido, que emplea como fase estacionaria un líquido no volátil que recubre el interior de la columna. En cambio, la cromatografía de adsorción gas-sólido utiliza como fase estacionaria

partículas sólidas sobre las que el soluto puede adsorberse.

D. **En función de los objetivos que se persigan**. Cuando los métodos cromatográficos se aplican con fines cualitativos y/o cuantitativos se habla de *cromatografía analítica*. En cambio cuando el objetivo es simplemente aislar compuestos para posteriormente continuar investigaciones con ellos, se habla de *cromatografía preparativa*.

Obviamente, en la práctica estas clasificaciones se mezclan. Así, la cromatografía líquida en columna puede experimentar los cuatro mecanismos de separación (adsorción, reparto, intercambio iónico y filtración sobre gel) y aplicarse con fines analíticos o preparativos; de forma parecida sucede con la cromatografía plana (que es también cromatografía líquida), en tanto la cromatografía de gases tiene lugar solo en columna y se ponen de manifiesto los mecanismos de reparto y adsorción.

Las figuras 8.2 y 8.3 resumen dos maneras de integrar los criterios de clasificación de los métodos cromatográficos descritos con anterioridad.

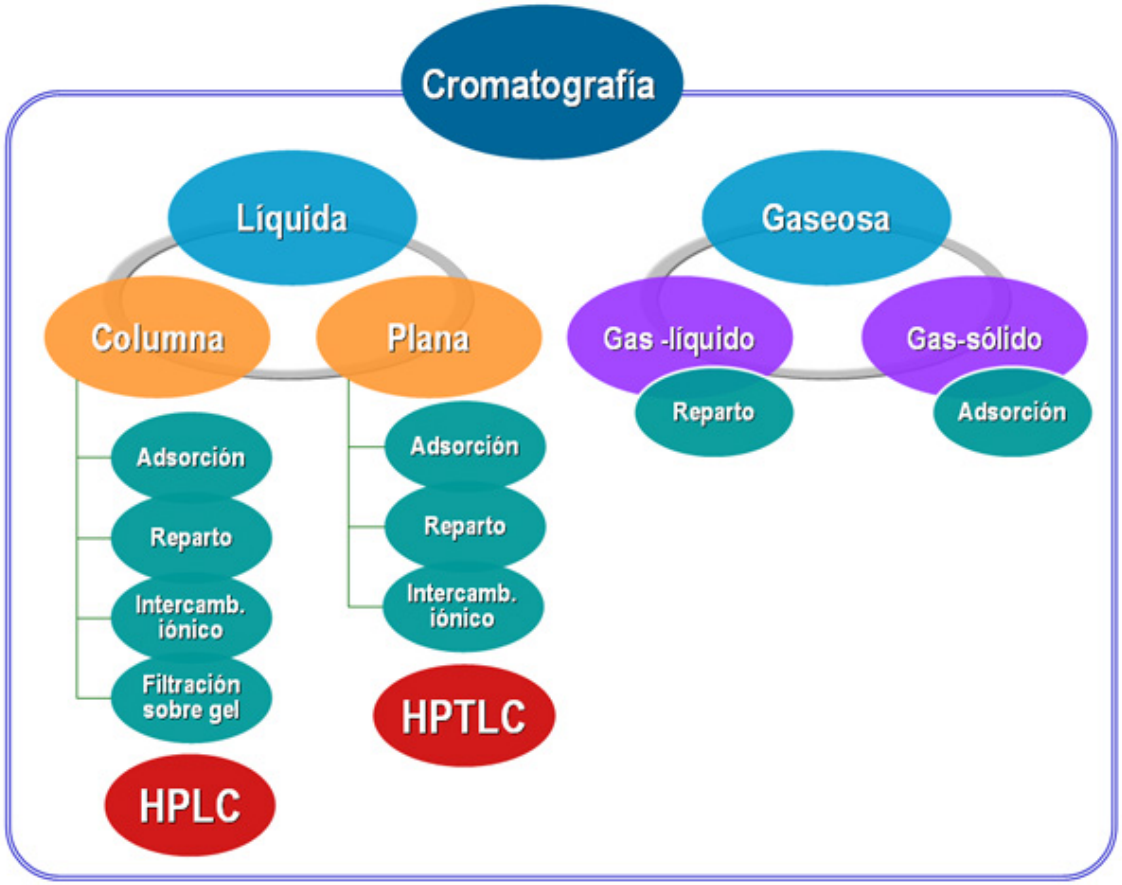


Figura 8.2. Clasificación de los métodos cromatográficos tomando como eje conductor el estado de agregación de la fase móvil.

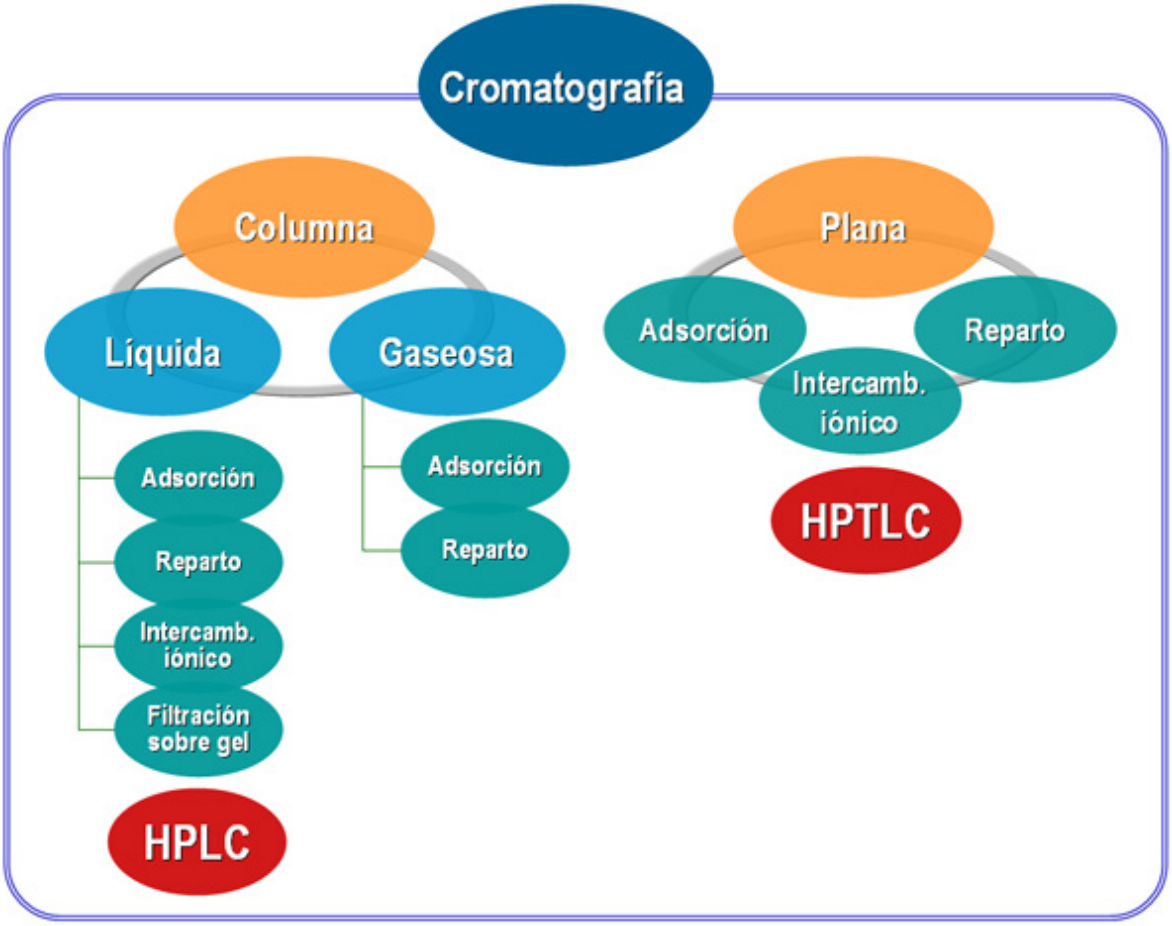


Figura 8.3. Clasificación de los métodos cromatográficos tomando como eje conductor la disposición de la fase estacionaria

8.3. MECANISMOS DE SEPARACIÓN CROMATOGRÁFICA

8.3.1. Cromatografía de adsorción

La totalidad de los primeros trabajos realizados en cromatografía correspondía al tipo denominado de adsorción, en el cual la fase estacionaria (FE) es la superficie de un sólido finamente dividido. De ahí que la cromatografía de adsorción se inserte en la clasificación del tipo de cromatografía líquido-sólido o gas-sólido.

Cuando la muestra disuelta en la fase móvil (FM) se pone en contacto con las primeras capas de adsorbente, este retiene parcialmente al sólido, estableciéndose con rapidez un equilibrio entre la cantidad de muestra en la FM y la retenida por el adsorbente (FE). Este equilibrio es dinámico y reversible.

La separación se realiza en virtud de las diferencias de comportamiento de las sustancias que desean separarse, atendiendo a su adsorción preferencial por la superficie de un sólido (FE) mientras se mueven por la acción de un disolvente (FM) que puede ser un líquido o un gas (aunque, como ya se ha mencionado, en lo adelante nos referiremos solamente a la cromatografía líquido-líquido pues la cromatografía gas-líquido se estudiará en un tema independiente).

La FE adsorbe los componentes de la mezcla de sustancias que desean separarse, mientras que la FM será la encargada de desorberlos. En dependencia de la fortaleza con que los compuestos se adsorban a la FE, la FM podrá desorberlos (arrastrarlos) con mayor o menor facilidad. Es este fenómeno el que posibilita que los solutos puedan ser separados, dado que, en función de su afinidad por la FE, los mismos se moverán a diferentes velocidades. Se plantea que el soluto compite por los sitios activos de la superficie del sólido (FE) con el disolvente utilizado como eluyente (FM).

Es importante señalar que la adsorción es un fenómeno superficial, que no involucra la formación de enlaces químicos entre el soluto y la FE. La fuerza con la que los adsorbentes retienen a los componentes de la muestra es de naturaleza muy diversa, destacándose entre ellas las causadas por fuerzas electrostáticas y de Vander Walls e interacciones dipolo-dipolo. La adsorción de los componentes de la muestra depende de la estructura de las sustancias y del desarrollo superficial del adsorbente. Mientras mayor sea la superficie específica de un sólido, mayor será su poder de adsorción.

La elección del adsorbente es importante en el éxito de la separación que se pretende realizar. La sílica gel o gel de sílice es sin duda el adsorbente (FE) más utilizado para la cromatografía de adsorción aunque también se utiliza mucho el óxido de aluminio (alúmina) y en menor proporción otros como el óxido de magnesio activo, el carbón activo, el silicato de magnesio activo y la celulosa.

La actividad de un adsorbente depende de su naturaleza y del tratamiento previo al cual este haya sido sometido. Esta actividad es una medida de la disponibilidad de los centros activos (de adsorción) de un adsorbente. Por lo general los adsorbentes muy activos tienden a captar agua del ambiente, disminuyendo así gradualmente su capacidad adsortiva.

Para lograr el grado de actividad requerido en un proceso analítico dado, se precisa deshidratar completamente el adsorbente. En el caso del gel de sílice y el óxido de aluminio (los cuales se comercializan con cierto contenido de humedad), la activación se realiza calentando el adsorbente a 350 ºC durante 1 – 2 horas.

La elección de la fase móvil (FM) es fundamental para el éxito de la cromatografía de adsorción. Usualmente se utilizan solventes orgánicos de diferente capacidad de desorción. El parámetro que define la capacidad de un solvente (FM) para desorber una sustancia es la fuerza de elución, la cual está relacionada con su polaridad y con su capacidad para competir con los solutos con los centros activos del adsorbente. De forma general, a mayor polaridad del solvente, mayor fuerza de elución. La figura 8.4 muestra algunos solventes de uso frecuente en cromatografía de adsorción organizados en función de su polaridad y fuerza de elución.

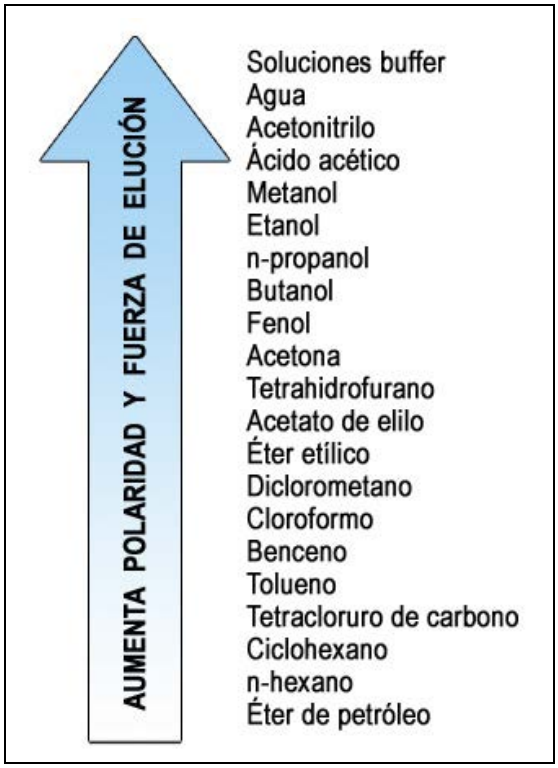


Figura 8.4. Solventes de empleo frecuente en cromatografía de adsorción

Existen diferencias en la tendencia de los compuestos a adsorberse. Por ejemplo puede encontrarse una correlación positiva entre las propiedades de adsorción y el número de grupos hidroxilos de una molécula; existe una correlación similar con los dobles enlaces y los compuestos que contienen ciertos grupos funcionales tienden a ser más fuertemente retenidos que otros. Así, la tendencia a ser adsorbido disminuye en el siguiente orden: ácido > alcohol > carbonilo > ester > hidrocarburos. También influye la naturaleza del adsorbente (FE). Gran parte de los conocimientos sobre este campo son empíricos y la elección del adsorbente (FE) y del disolvente (FM) para una separación dada debe hacerse con frecuencia en base a tanteos.

8.3.2. Cromatografía de reparto

La cromatografía de partición o reparto (cromatografía líquido-líquido o gas-líquido) se originó en 1941 a partir del trabajo de los ganadores del Premio Nobel, Martin y Synge.

Dicho procedimiento se fundamenta en el fenómeno de reparto, es decir, en la distribución de una mezcla de solutos (sustancias que se desean separar) entre 2 fases inmiscibles. El reparto o distribución del soluto tiene lugar, atendiendo a su solubilidad preferencial (lo cual depende de su polaridad), entre la fase estacionaria (FE) líquida unida a un soporte sólido inerte, y la fase móvil (FM) que resulta ser el disolvente que fluye a través de la FE y que puede ser un líquido o un gas.

En lo adelante nos referiremos solamente a la cromatografía líquido-líquido, pues la cromatografía gas-líquido se estudiará en un capítulo independiente.

Cuando la FE líquida es polar (generalmente el agua) y la FM es un solvente apolar, se habla de cromatografía de partición clásica o cromatografía de fase normal y los solutos se distribuirán según su solubilidad preferencial por alguna de las 2 fases. Así por ejemplo, si se desean separar 2 solutos de diferente polaridad empleando como FE el agua y como FM el éter de petróleo, aquel de los solutos que sea menos polar viajará por la FE a mayor velocidad puesto que será más fácilmente arrastrado por la FM en tanto el otro se moverá más lentamente dada su afinidad preferencial por la FE.

Ahora bien, cuando la FE líquida es apolar, se habla entonces de cromatografía de fase reversa y en este caso la FM ha de ser un solvente polar o al menos de mayor polaridad que la FE. La cromatografía de fase reversa se instrumentó ordinariamente en sus inicios embebiendo el soporte sólido con una sustancia apolar.

Dada la naturaleza del proceso de partición es necesario escoger adecuadamente los solventes a utilizar. En primer lugar estos deben tener una solubilidad con la FE limitada; en caso ideal la FM y la FE deberían ser inmiscibles entre si.

El proceso de partición puede describirse a través de la ley del reparto de Nernst según:

$$K = \frac{C_1}{C_2}$$

donde K es el coeficiente de reparto, C_1 y C_2 representan respectivamente las concentraciones en equilibrio del soluto en las fases estacionaria y móvil.

Otro parámetro importante relacionado con la constante de reparto, que expresa la eficiencia de un proceso cromatográfico es el factor de separación (α). Así para dos solutos A y B, la magnitud α puede calcularse según:

$$\alpha = \frac{K_A}{K_B}$$

Siendo K_A y K_B las constantes de reparto de los solutos A y B respectivamente. Cuando $\alpha = 1$ no habrá separación pues ambos solutos tienen idéntica afinidad por la FM y la FE, y consecuentemente la separación entre ellos será mayor cuanto mas difiera α de la unidad.

Los soportes utilizados para contener la FE líquida en cromatografía de reparto requieren poseer una buena capacidad de retención de líquidos mientras que por naturaleza propia o a consecuencia de la adsorción de la FE líquida, debe carecer de acción frente a los solutos que se pretenden cromatografiar; quiere decir que bajo las condiciones que se realice el análisis no deben producirse fenómenos de adsorción pues la combinación de fenómenos de reparto y adsorción en un mismo procedimiento cromatográfico conduce a una mala separación y a pérdidas de solutos en el proceso.

Los soporte más comúnmente usados en cromatografía de reparto son la sílica gel, el polvo de celulosa y el kieselguhr, entonos los casos, embebidos con la fase estacionaria.

Un tipo de empaque cuyo uso se ha generalizado en la actualidad es la llamada cromatografía de fase ligada o cromatografía de fase químicamente unida, que consiste en unir químicamente determinados grupos funcionales al soporte. Las superficies de fase ligada ofrecen una considerable ventaja con respecto a los líquidos sostenidos sobre sólidos ya que el soporte no puede perder su líquido (FE) por la acción de la fase móvil. Sobre este particular se profundizará con detalles en el capítulo 8. A modo de ejemplo, la tabla 8.1 ilustra el comportamiento de algunas fases ligadas comercializadas industrialmente.

Tabla 8.1. Cromatografía de fase ligada con soporte de sílica gel.

Nombre	Grupo funcional unido	Tipo	Aplicaciones
Tipo Diol	Si-$(CH_2)_3$-O-CH_2-CH(OH)-CH_2(OH)	Fase normal	Compuestos polares
Tipo Amino	Si-$(CH_2)_3$-NH_2	Fase normal	Compuestos polares
Tipo Ciano	Si-$(CH_2)_3$-CN	Fase normal	Compuestos moderadamente polares y polares
Tipo Ester	Si-OR	Fase normal	Compuestos polares
Tipo Siloxano	Si-O-SiR	Fase normal	Compuestos polares
RP-2 o C-2	Si-$(CH_3)_2$	Fase reversa	Compuestos apolares y moderadamente polares
RP-8 o C-8	Si-$(CH_2)_7$-CH_3	Fase reversa	Compuestos apolares y moderadamente polares
RP-18 o C-18	Si-$(CH_2)_{17}$-CH_3	Fase reversa	Compuestos apolares y moderadamente polares

La fuerza de elución de los solventes empleados en cromatografía de partición dependerá del tipo de la naturaleza de la FE. Así, si estamos en presencia de una partición en fase normal los solventes más polares tendrán una mayor fuerza de elución pues serán más afines con los solutos que interactúan con la FE, en cambio si se trata de una cromatografía de fase reversa, los solventes menos polares serán los que con mayor facilidad interactuaran con los solutos evidenciando una mayor fuerza de elución.

8.3.3. Cromatografía de intercambio iónico

La interacción que tiene lugar en este tipo de cromatografía es de naturaleza iónica, es decir los componentes de la mezcla que se desean separar tienen que estar en forma de iones cargados.

Los intercambiadores de iones son compuestos orgánicos sintéticos llamados resinas, que poseen cargas positivas o negativas y están unidos a contraiones lábiles de carga opuesta que son desplazados con facilidad por los iones de la muestra, los cuales interaccionan con la resina y ocupan sus centros activos (positivos o negativos) luego de intercambiarse con los contraiones.

Dicho de otra forma, la separación se basa en el equilibrio que se establece por parte de los iones del soluto entre el disolvente (FM) y los grupos cargados positiva o negativamente contenidos en la fase estacionaria sólida (resina intercambiadora). Así, la cromatografía de intercambio iónico en función del estado de agregación de la FM y la FE se clasifica como cromatografía líquido – sólido.

Las resinas intercambiadoras pueden ser catiónicas o aniónicas, en dependencia de su carga y de los solutos que intercambien.

Las resinas catiónicas poseen grupos funcionales cargados negativamente y se emplean para separar iones de carga positiva (de ahí su nombre de catiónicas) que son atraídos por la resina y se intercambian con los contraiones lábiles.

Las resinas aniónicas están por el contrario cargadas positivamente y se emplean para separar iones de carga negativa (de ahí su nombre de aniónicas) que se intercambian igualmente con los contraiones lábiles.

La figura 8.5 muestra un esquema de la estructura general de las resinas intercambiadoras unidas a sus contraiones lábiles.

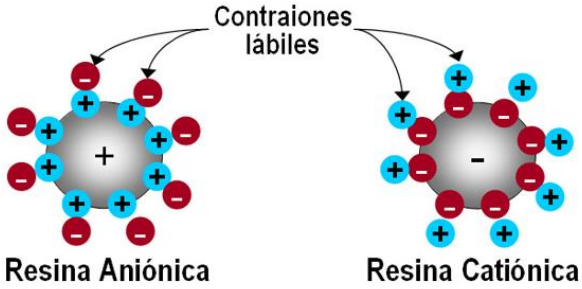


Figura 8.5. Resinas intercambiadoras.

El mecanismo de intercambio iónico se describe a continuación tomando como ejemplo la separación de una mezcla de iones de carga negativa, para lo cual es necesario emplear una resina aniónica. Las etapas que tienen lugar en el proceso de separación cromatográfica son las siguientes:

1. Equilibrar la resina

El primer paso del proceso consiste en equilibrar la resina de intercambio iónico, es decir hacer pasar a través de la columna cromatográfica que contiene la fase estacionaria una disolución que aporte los contraiones lábiles de carga opuesta (negativa en este caso pues se trata de una resina aniónica) que ocupe los sitios activos positivos de la resina. (figura 8.6)

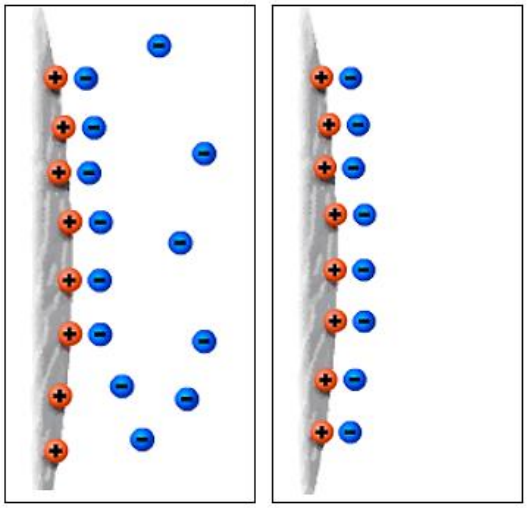


Figura 8.6.
Equilibrio de la resina

2. Aplicación de la muestra

En esta segunda etapa se aplica la muestra formada por los iones de carga negativa que se desean separar. Los componentes de la mezcla son atraídos por la fase estacionaria (resina aniónica) y se intercambian con los contraiones lábiles ocupando los sitios activos de la resina. La fuerza con la que estos aniones se fijen a la resina dependerá de su densidad de carga; así, los iones de mayor densidad de carga negativa se fijarán con mayor fuerza mientras que los de menor densidad de carga lo harán más débilmente. De cualquier manera todos los aniones desplazarán a los contraiones y quedarán adheridos a la resina de carga opuesta, ocurriendo así el primero de los intercambios (figura 8.7)

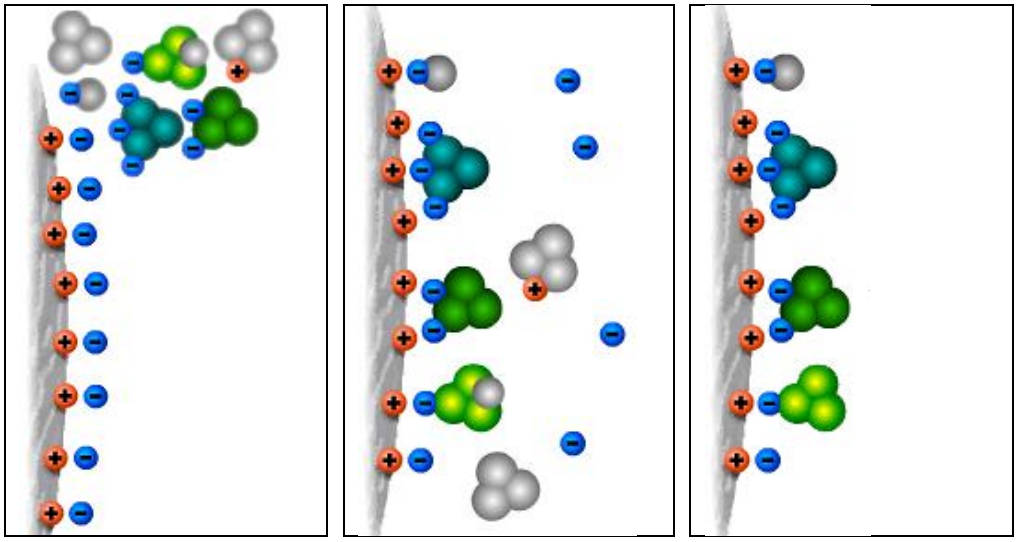


Figura 8.7. Aplicación de la muestra

3. Separación de los componentes

Para eluir los componentes fijados a la resina se hace pasar ahora por la columna cromatográfica un disolvente que actúa como fase móvil y contiene iones de carga negativa que efectúan un segundo intercambio iónico desplazando a los solutos de los centros activos de la fase estacionaria (figura 8.8).

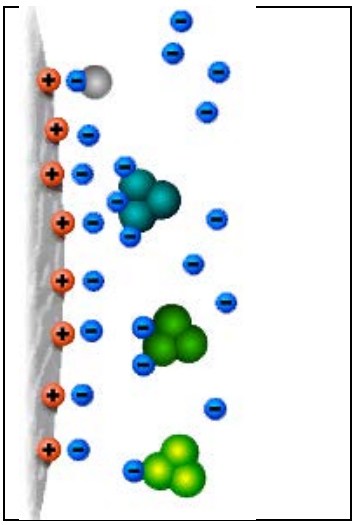


Figura 8.8. Separación de los solutos

La diferencia de velocidad de los iones de la muestra estará en dependencia de la fuerza con estén fijados a la resina, es decir dependerá de su fuerza iónica. Aquellos solutos más débilmente unidos a la fase estacionaria serán los primeros en ser desplazados (intercambiados) por los iones de la fase móvil y por lo tanto de moverán a mayor velocidad, en tanto aquellos más fuertemente adsorbidos, por poseer una mayor densidad de carga negativa serán más difíciles de

desplazar por el disolvente iónico (FM) y se moverán a menor velocidad (figura 8.8), lo que garantiza su separación de los primeros.

4. Regeneración de la resina

Una vez separados los solutos (aniones en este caso), es necesario regenerar la resina para recuperar sus condiciones iniciales, es decir, hacer pasar nuevamente la solución contentiva de los contraiones lábiles. Así, quedará lista la resina para realizar un nuevo proceso de separación por intercambio iónico.

Resulta esencial comprender que la fuerza con que es retenido un ion por un intercambiador depende de la naturaleza de ambos. Así, para una misma resina las diferencias con que son retenidas las distintas especies iónicas de una solución dependerán de la naturaleza de los iones y del pH del medio, pues este último influye en la ionización del compuesto.

Por ejemplo, un intercambiador catiónico a través del cual se pasa una solución de cationes de diversa carga, retiene preferentemente y con mayor fuerza aquellos de mayor carga y con menor fuerza a los de carga unitaria, estableciéndose un orden de retención como se indica a continuación: $M^{4+} > M^{3+} > M^{2+} > M^{+}$.

Por otra parte, dentro de un grupo de cationes con la misma carga se establece también un orden de retención, siendo fijados con mayor fuerza aquellos cationes con menor diámetro efectivo y aquellos menos fuertemente retenidos serán los más voluminosos.

Los grupos funcionales de las resinas catiónicas son principalmente los grupos sulfónico o carboxilo dispuestos sobre una matriz orgánica de poliestireno o poliacrílica. Las resinas aniónicas por su parte, están constituidas por bases insolubles cuyos grupos funcionales son aminas terciarias o grupos amonio cuaternario dispuestos igualmente sobre una soporte orgánico de poliestireno.

La figura 8.9 muestra la estructura de dos resinas intercambiadoras en soporte de celulosa, mientras en las tablas 8.2 y 8.3 se presentan algunos intercambiadores de mayor empleo en cromatografía.

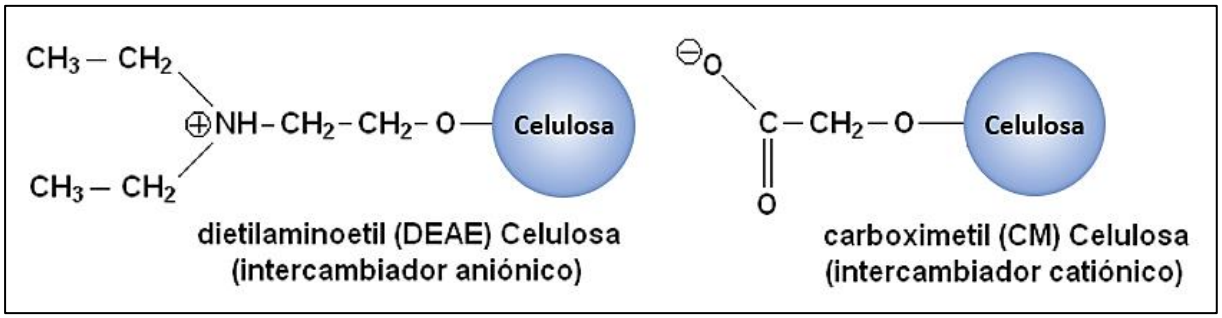


Figura 8.9. Estructura de dos resinas intercambiadoras en soporte de celulosa

Tabla 8.2. Intercambiadores comerciales usados en cromatografía

Tipo	Nombre comercial	Fortaleza	Grupo funcional	Rango útil de pH
Catiónico	Amberlite IR 120	Ácido fuerte		1-14
	Dowex 50 (X1-X16)	Ácido fuerte	$-SO_3H$	1-14
	Wofatit KPS 200	Ácido fuerte	$-SO_3H$	1-12
	Celulosa fosforilada	Ácido fuerte	$-O-PO_3-H_2$	
	Amberlite IRC 50	Ácido débil	-COOH	5-14
	Wofatit CF 300	Ácido débil	-COOH	
	Zeocarb 226	Ácido débil	-COOH	
	Carboximetil celulosa	Ácido débil	$-O-CH_2-COOH$	
Aniónico	Amberlite IRA 400	Base muy fuerte	$-N\ (CH_3)3$	1-14
	Dowex 1 (X1-X16)	Base muy fuerte	$-N\ (CH_3)3$	1-14
	Amberlite IRA 410	Base fuerte	-N (alquil)2 alquilol	1-12
	Dowex 2 (X1-X10)	Base fuerte	-N (alquil)2 alquilol	1-14
	DEAE Celulosa	Base fuerte	$-C_2H_4-N(-C_2H_5)_2$	
	Amberlite IR 45	Base débil	$-NR_2$	1-9
	Dowex 3	Base débil	$-NR_2$	1-9

Tabla 8.3. Tipos de intercambiadores y sus aplicaciones

Tipo de resina	Soporte + grupo funcional	Aplicaciones
Cambiadora de cationes (fuertemente ácida)	Poliestireno sulfonado.	Cationes, vitaminas, péptidos y aminoácidos.
Cambiadora de cationes (débilmente ácida)	Polimetacrilato carboxilado.	Cationes, antibióticos y bases orgánicas.
Cambiadora de aniones (fuertemente básica)	Poliestireno con amina cuaternaria.	Alcaloides, halógenos, aniones y ácidos grasos.
Cambiadora de aniones (débilmente básica)	Poliestireno con amina terciaria o poliamida	Iones complejos y aniones de diferente valencia.

8.3.4. Cromatografía de filtración sobre gel

Este tipo de cromatografía, conocido por las siglas GPC (del inglés *Gel Permeation Chromatography*), también llamada cromatografía de exclusión molecular, se usa en la separación de mezclas de compuestos en función de la masa molecular de estos (magnitud que está relacionada directamente con sus dimensiones). Así, esta cromatografía es aplicable a compuestos con masas moleculares superiores a 2000, los cuales pueden ser solubles en agua o solubles en solventes orgánicos.

La fase estacionaria se obtiene al mezclar un material polímero inerte de elevado grado de hidratación con agua o soluciones buffer. El resultado es un gel

formado por gránulos o perlas con estructura parecida a un tamiz que contienen poros de diferente tamaño (figura 8.10)

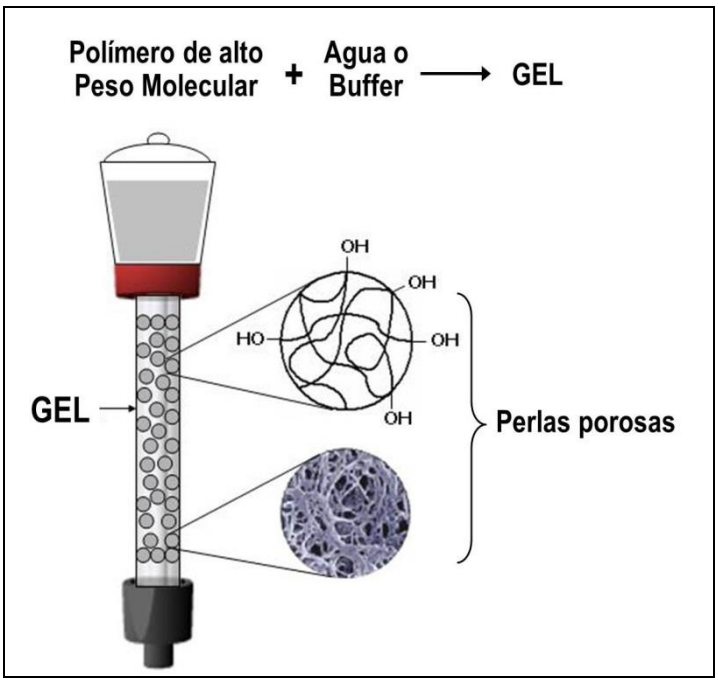


Figura 8.10. Estructura del gel para cromatografía de exclusión molecular

El mecanismo de separación consiste en que la solución de la muestra se hace pasar a través del gel que posee un tamaño de poro determinado. Las moléculas de alto peso molecular con tamaño superior al de los poros de las partículas del gel no pueden penetrar en los mismos (se dice que son excluidas) y se mueven libremente a través de la fase acuosa en el exterior de los gránulos, entre los espacios interpartícula, mientras que las de tamaño inferior al de los poros se introducen en estos y ven obstaculizado su paso a través del gel, por lo que su avance a través de la columna se retrasa (figura 8.11)

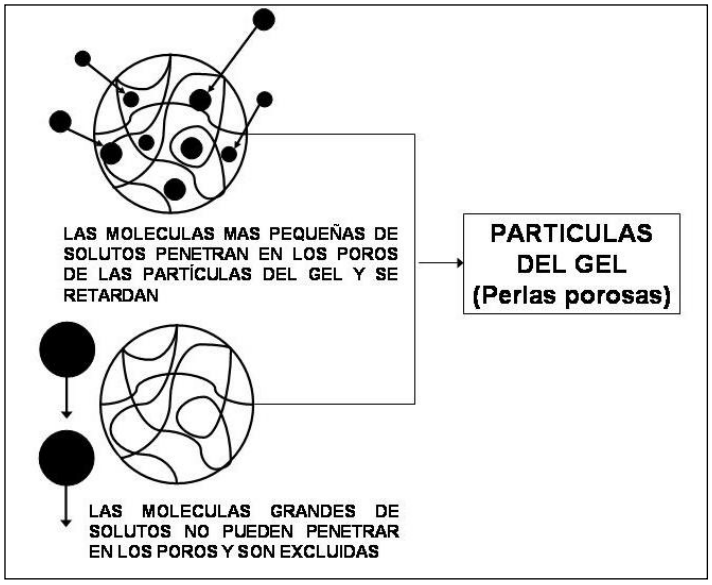


Figura 8.11. Proceso de exclusión molecular visto con aumento

La fase móvil está constituida por moléculas muy pequeñas que pueden penetrar en todos los poros y son las últimas en salir de la columna. En general el orden de elución está dado por el tamaño (o la masa molecular). Las moléculas

grandes eluyen primero y le siguen las demás en orden decreciente de sus masas moleculares. La figura 8.12 ilustra este comportamiento.

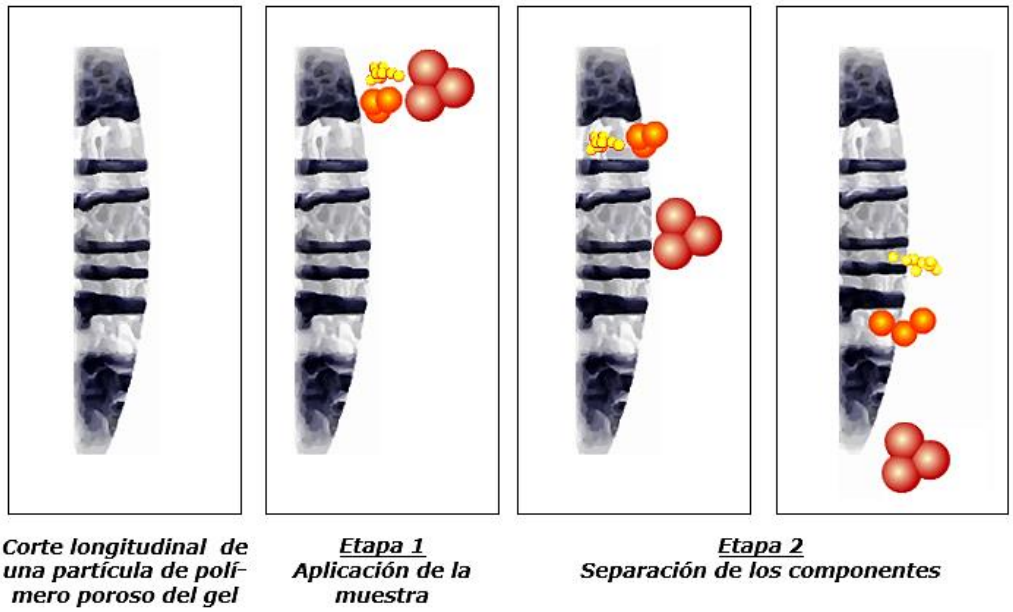


Figura 8.12. Mecanismo de exclusión molecular

En la cromatografía de filtración sobre gel la fase móvil es generalmente agua o soluciones buffer y la fase estacionaria es el líquido acuoso del gel que se encuentra en el exterior de los gránulos en los espacios interpartículas, de manera que en este caso se trata de una cromatografía líquido – líquido.

Los polímeros empleados para formar el gel pueden obtenerse con diferente tamaño de poro, lo que condiciona el intervalo de masas moleculares que pueden ser separadas eficientemente. En sus inicios, los polímeros más empleados para GPC fueron, entre otros, el Sephadex y el Biogel. La tabla 8.4 muestra las características de los geles obtenidos con estos polímeros.

Tabla 8.4. Algunos geles hidrófilos

Tipo de gel	**Rango aproximado de separación**	
	Proteínas globulares (PM)	**Polisacáridos (PM)**
Sephadex G-25	1000 – 5000	100 – 5000
Sephadex G-50	1500 – 30 000	500 – 10 000
Sephadex G-100	4000 – 150 000	1000 – 100 000
Sephadex G-150	5000 – 400 000	1000 – 150 000
Sephadex G-200	5000 – 800 000	1000 – 200 000
Biogel p-10	–	5000 – 17 000
Biogel p-30	–	20 000 – 50 000
Biogel p-100	–	40 000 – 100 000
Biogel p-200	–	80 000 – 300 000
Biogel p-300	–	100 000 – 400 000

Las aplicaciones fundamentales de la cromatografía de exclusión molecular están dirigidas a la separación de sustancias de alto peso molecular como proteínas, polisacáridos, polímeros de triacilgricéridos, colorantes de alto peso molecular, virus, ribosomas, bacterias, etc.

También se emplea en la desalinización y separación de moléculas de bajo peso molecular mezcladas con moléculas de alto peso molecular y en la determinación del peso molecular de macromoléculas.

Antes de concluir este capítulo, debe señalarse que en el presente libro no se explicarán los diferentes métodos cromatográficos siguiendo la cronología histórica de su aparición y desarrollo sino que, por razones metodológicas, seguiremos el esquema propuesto en la figura 8.3. Es decir, se abordarán primero los métodos de cromatografía en columna líquida y gaseosa (en ese orden, a pesar que en el desarrollo histórico de los métodos cromatográficos la cromatografía de gases fue la primera en alcanzar avances significativos en la separación de compuestos volátiles y mostró un claro predominio a mediados del pasado siglo sobre el resto de las técnicas cromatográficas) y finalmente los métodos de cromatografía plana.

Trabajo Independiente

Consulte los apéndices C-1 y C-2, en los que aparece un resumen del presente capítulo.

BIBLIOGRAFÍA.

1. Bermejo, R; Moreno, A. (2014). Análisis Instrumental. Editorial Síntesis S. A. Madrid.
2. Dierksmeier, G. (2005). Métodos cromatográficos. Editorial Científico Técnica. Impreso por Impresol Ediciones Ltda. Bogotá, Colombia.
3. IUPAC (1974). Recommendations of nomenclature for chromatography. IUPAC 37, 447-462.
4. Rubinson, K & Rubinson, J. (2001). Análisis Instrumental. Pearson Educación SA. Madrid
5. Shoenbein, C. F. (1861). Verhandel. Naturforsch. Ges. Basel 3 Seite 249.
6. Skoog, D; Holler, J; Crouch, S. (2008). Principios de análisis instrumental. 6ta ed. Cengage Learning Editores.
7. Tswett, M. (1903). Proc. Warsaw Soc. Nat. Sci. Biol. Sect.

9 Cromatografía en columna

9.1. GENERALIDADES.

La cromatografía en columna utiliza para su realización unos tubos largos y estrechos dentro de los cuales está contenida la fase estacionaria. El proceso de separación cromatográfica que tiene lugar en el interior de la columna se describe a continuación:

Considérese una muestra de dos componentes, A y B, que se van a separar en una columna por cromatografía, utilizando una fase estacionaria sólida o líquida (según se describió en el epígrafe 8.3 del capítulo 8) y como fase móvil un líquido que actúa como eluyente. La figura 9.1 muestra las distintas etapas de la separación.

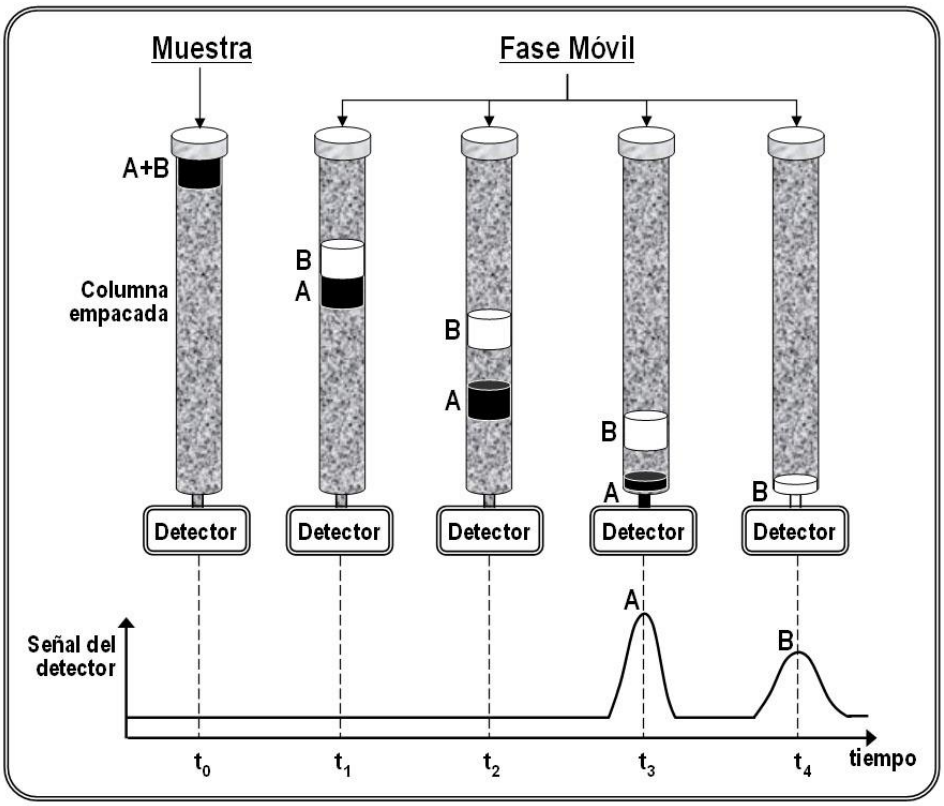


Figura 9.1. Etapas de la separación cromatográfica

Inicialmente se introduce la muestra con los componentes A y B, disuelta en el eluyente (FM), en la columna (tiempo t_0), con lo que A y B se distribuirán entre las dos fases. Al ir añadiendo eluyente a la columna la muestra irá descendiendo, pero a la vez se producirá una distribución de sus componentes entre las fases móvil y estacionaria atendiendo a las diferencias de afinidad de los componentes por ambas fases en función del mecanismo de separación que tenga lugar

(adsorción, reparto, intercambio iónico o exclusión molecular). Estas diferencias de afinidad irán produciendo la separación de A y B (tiempos t_1 y t_2) en la medida que transitan por la columna. Finalmente, los componentes llegan a salir por el extremo de la columna donde pueden ser recogidos. El primer componente en salir (eluir) será el menos retenido por la fase estacionaria, en este ejemplo, el A (tiempo t_3), y posteriormente eluirá aquel que haya sido más fuertemente retenido, en este caso el B (tiempo t_4).

En el extremo de la columna se puede colocar un detector que permita medir una magnitud representativa de la concentración de cada componente. La señal (magnitud medida) se representa habitualmente en función del tiempo y la gráfica obtenida se conoce como cromatograma. Al pie de la figura 9.1, se recoge el cromatograma que corresponde a la separación efectuada. Las señales obtenidas de cada componente se denominan picos, que quedan definidos por el tiempo de retención (tiempo correspondiente a la aparición del pico del soluto en el cromatograma respecto al momento inicial de introducción del compuesto en la columna) y por el área del pico (representativa de la concentración del componente). Así, los tiempos de retención pueden utilizarse para análisis cualitativo, y las áreas, en análisis cuantitativo.

9.2. ETAPAS DE TRABAJO DE LA CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA EN COLUMNA CONVENCIONAL.

En los marcos de este libro, definimos la cromatografía líquida en columna convencional como aquella que se realiza por etapas y con un bajo o ningún grado de automatización. En la actualidad este procedimiento se emplea muy poco y ha dado paso a la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, del inglés *High Performance Liquid Chromatography*), sin embargo los principios más generales siguen siendo los mismos y la explicación de cada una de las etapas de separación por cromatografía convencional ayudará a comprender más adelante el funcionamiento automatizado de la HPLC.

Las etapas generales de este proceso son: selección y preparación de la fase móvil y la fase estacionaria, aplicación de la muestra, corrida cromatográfica y elución, recogida de los eluatos y detección de los componente separados.

9.2.1. Selección y preparación de la fase móvil y la fase estacionaria

La selección de la fase móvil y la fase estacionaria dependerá de la estructura y características de los compuestos a separar, lo que condiciona el mecanismo de separación que tendrá lugar en la columna cromatográfica. Así, si se trata de compuestos en los que predominan sus características de polaridad puede elegirse la cromatografía de reparto o la cromatografía de adsorción con sus correspondientes soportes y eluyentes (ver epígrafe 7.3, capitulo 7). Sin embargo si los solutos a separar son ionizables, una opción importante sería la elección de resinas intercambiadoras como fase estacionaria, privilegiando el

mecanismo de intercambio iónico. Finalmente, si se desean separar compuestos de masas moleculares superiores a 2000, entonces habría que acudir a la cromatografía de filtración sobre gel.

Una vez seleccionada la fase estacionaria, esta se coloca dentro de la columna, la cual es generalmente un tubo de vidrio de longitud variable cuyas dimensiones guardan la relación 30:1 (largo:diámetro interno).

La columna lleva colocada en su extremo inferior una llave que actúa como regulador del flujo de la fase móvil, y muy cerca de este extremo poseen un material filtrante, que puede ser vidrio aglomerado de diversas porosidades, para evitar que la fase estacionaria se salga. Así mismo, una columna clásica puede poseer en su extremo superior un ensanchamiento que sirve de reservorio del solvente, lo que permite mantener durante mayor tiempo condiciones estables de flujo de la fase móvil en la columna.

La figura 9.2 muestra un esquema de una columna cromatográfica para trabajos rutinarios.

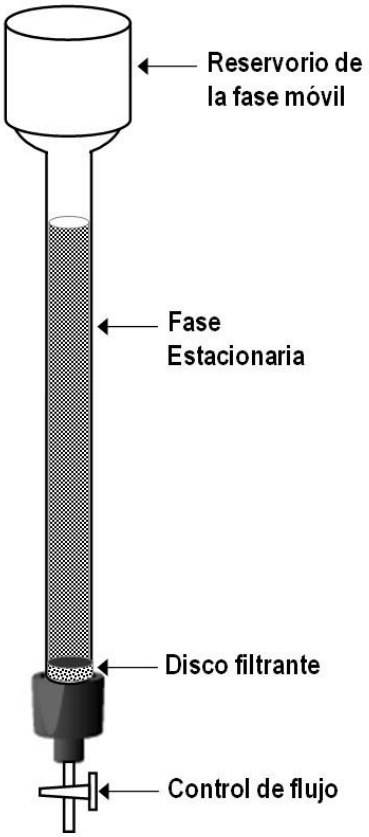


Figura 9.2. Columna cromatográfica con reservorio de solvente

La cantidad de fase estacionaria que debe añadirse en la columna dependerá del problema analítico a resolver. En general esto está definido en la técnica analítica que se realiza, o de lo contrario pueden realizarse ensayos previos y determinarse empíricamente.

El llenado de la columna es una etapa de la que depende en buena parte la eficiencia del método. Debe garantizarse un empaquetamiento compacto de la fase estacionaria dentro de la columna, evitando en todo momento la presencia de burbujas de aire o de solvente volátil, así como impedir que esta se seque después que haya sido eluida con algún solvente y no se haya terminado el trabajo con ella. Si n se mantienen estos cuidados, se producen grietas que constituyen viñas preferenciales para los solventes usados como fase móvil disminuyendo la eficiencia del proceso. En general se obtienen buenos resultados cuando la fase estacionaria se hace llegar a la columna suspendida en un solvente, que ha de ser el de menor polaridad de todos los que se pretendan utilizar en la separación.

9.2.2. Aplicación de la muestra.

La aplicación de la muestra en la columna cromatográfica tiene también importancia sobre la calidad del resultado final. La muestra debe incorporarse a la columna disuelta en una pequeña cantidad de fase móvil, cuando el solvente con el que se cargó la columna haya penetrado totalmente en la fase estacionaria. La aplicación se realiza con pipeta empleando volúmenes relativamente grandes en el orden de los mililitros.

9.2.3. Corrida cromatográfica y elución de los componentes

La corrida cromatográfica consiste en hacer pasar la fase móvil a través de la columna cromatográfica. En este momento los componentes de la muestra aplicada comenzaran a moverse a lo largo de la fase estacionaria arrastrados por el solvente que actúa como fase móvil. La diferencia de velocidad con la que se mueven cada uno de ellos dependerá de sus diferencias de afinidad por la fase estacionaria y por la fase móvil, lo que condiciona su separación y el orden con el que saldrán por el extremo inferior de la columna cromatográfica. Este proceso se conoce con el nombre de elución.

Existen diferentes modos de eluir los componentes de la mezcla aplicada en función de la composición de la fase móvil empleada en la corrida cromatográfica, ellos son: elución isocrática, elución por etapas y elución en gradiente, los cuales se describen a continuación.

A. Elución isocrática

La elución isocrática es aquella que se realiza cuando la composición de la fase móvil no varía durante el proceso cromatográfico. Por ejemplo si en una separación cromatográfica se emplea como fase móvil metanol o una mezcla metanol:agua (2:1 V-V) desde el comienzo hasta el final de la corrida cromatográfica, estamos en presencia de un sistema isocrático de elución.

B. Elución por etapas

Ocurre con frecuencia que un solo solvente o sistema de solventes no es capaz de lograr una adecuada separación de los componentes de una muestra, debido a la existencia de impurezas o contaminantes que pueden interferir en las etapas de separación. En estos casos es necesario eluir estas interferencias con una determinada fase móvil y posteriormente utilizar otros solventes para eluir los compuestos de interés analítico.

Un ejemplo ilustrativo es la determinación de ácido cítrico en vinos empleando como fase estacionaria una resina de intercambio aniónico. Una vez aplicados a la columna 10 mL de vino, la misma se lava 3 veces con 50 mL de agua destilada para eluir las sustancias neutras y aquellas cargadas positivamente, estos eluatos se desechan y posteriormente se hace pasa a través de la columna 200 mL de una solución de ácido acético 2.5 N para que los aniones acetatos se intercambien con los ácidos que están interactuando con la resina; la fuerza iónica del ácido acético es suficiente para eluir un grupo de ácidos, entre los que

se encuentra el ácido citromálico que constituye una interferencia, pero esta fase móvil no es capaz de desplazar los aniones del ácido cítrico, los cuales están mas fuertemente adheridos a la resina; este segundo eluato también se desecha y entonces se usa un tercer solvente (100 mL de hidróxido de sodio 2 N), cuya fuerza iónica es mayor que la del ácido acético, pudiendo ahora los aniones hidroxilos desplazar a los aniones citrato y eluir el ácido cítrico de interés en la determinación.

C. Elución con gradiente o gradiente de elución

El gradiente de elución es una variante mucho más eficiente que la elución por etapas para la separación de mezclas complejas pero el principio general es el mismo, es decir el cambio de la composición de la fase móvil durante el proceso de elución cromatográfica.

En este caso, a diferencia de la elución por etapas, la fase móvil atraviesa la columna cromatográfica como un flujo continuo, sin interrupciones, pero su composición (fuerza de elución) se hace variar gradualmente desde el inicio hasta el final de la separación cromatográfica. Esto se logra mezclando paulatinamente 2 solventes en orden creciente de fuerza de elución (polaridad o fuerza iónica según el mecanismo de separación) fuera de la columna de manera que el flujo que atraviesa la misma va cambiando gradualmente su composición.

Así por ejemplo un gradiente de polaridad ascendente para una columna de reparto fase normal se muestra en la figura 9.3.

Tal gradiente se logra mezclando metanol y agua de modo que al inicio de la corrida la fase móvil estará compuesta por únicamente por metanol y gradualmente su polaridad irá aumentando en la medida en que se mezcle con agua. De este modo se logra una mayor selectividad de la fase móvil que arrastrará selectivamente a los componentes de la mezcla los cuales eluirán en orden de polaridad ascendente, es decir, los menos polares se moverán con mayor velocidad y eluirán primero en tanto los más polares serán los últimos.

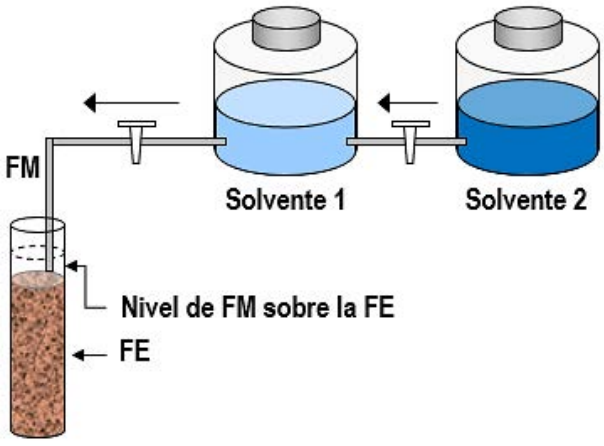


Figura 9.3.
Gradiente de polaridad ascendente

Con este sencillo procedimiento se pueden lograr gradientes lineales siempre y cuando los recipientes que contienen los solventes 1 y 2 poseen el mismo diámetro y contengan iguales volúmenes. Usando recipientes de diferente diámetro de obtienen mezclas con un aumento no lineal de 2 en 1.

9.2.4. Recogida de los eluatos y detección de los componentes

En la cromatografía en columna convencional más ortodoxa los componentes separados se recogen disueltos en la fase móvil a la salida de la columna cromatográfica. En este sentido la recogida de los eluatos puede realizarse de dos formas diferentes en dependencia de los objetivos que se persigan con la separación cromatográfica.

Si el objetivo del método es separar un único compuesto de resto de otros que se comportan como sustancias interferentes, usualmente se emplea un sistema de elución por etapas en el que en un primer momento, una vez aplicada la muestra, las interferencias se eluyen con un solvente que no desplace al compuesto de interés y estos eluatos se desechan. Posteriormente se hace pasar un segundo solvente para eluir al analito, el cual puede ser recogido en un matraz volumétrico u otro recipiente quedando listo para su cuantificación.

Puede suceder que, siguiendo este mismo objetivo, el compuesto de interés no interaccione con la fase estacionaria y la aplicación de la muestra se realice para que las sustancias interferentes queden adheridas a la fase estacionario mientras el analito fluye libremente con la fase móvil y se recoge igualmente en un recipiente adecuado.

Ahora bien, si el objetivo que se persigue es la separación de varios componentes de una muestra e interesa obtenerlos a todos de forma individual, entonces los eluatos se recogen con ayuda de un equipo llamado colector de fracciones.

El colector de fracciones es un dispositivo constituido por un tambor que contiene un gran número de viales o pequeños tubos de ensayo que recogen cierto volumen de eluatos según sea programado por el analista (figura 9.4).

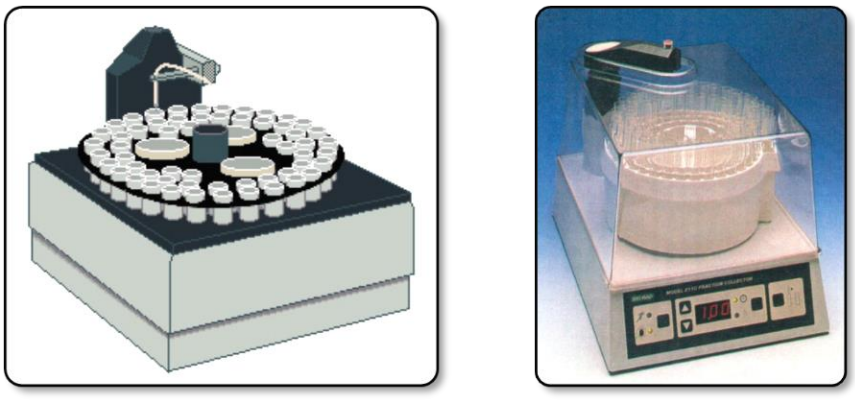


Figura 9.4. Colector de fracciones

En la medida que comienzan a eluir los componentes por el extremo de la columna, los eluatos se recogen en el colector de fracciones. El analista establece que volumen debe ser recogido en cada uno de los viales o tubos de ensayo y una vez que se haya alcanzado este volumen en un tubo, automáticamente el tambor se desplaza y coloca otro tubo vacío a la salida del flujo en la columna.

Este proceso se repite hasta culminar la corrida cromatográfica cuya duración es también establecida por el analista.

Al finalizar la corrida cromatográfica es necesario detectar los componentes eluidos, es decir determinar cuántos componentes han sido separados. Para ello se lee una señal analítica (absorbancia, fluorescencia, índice de refracción, etc.) a cada uno de los eluatos recogidos en cada uno de los tubos de ensayo (según el orden de elución) y se construye un cromatograma, que es un gráfico de señal vs. volumen de elución.

Supongamos que en una separación cromatográfica se ha recogido un volumen total de 60 mL en un colector de fracciones que ha sido regulado para recoger 1 mL en cada tubo. Al finalizar la corrida cromatográfica se tendrán entonces un total de 60 tubos de ensayo a los que se les determina individualmente una señal analítica (absorbancia por ejemplo, en un espectrofotómetro). Se obtendrán entonces 60 pares de valores de absorbancia vs. volumen de elución con los cuales se construye el cromatograma que aparece en la figura 9.5.

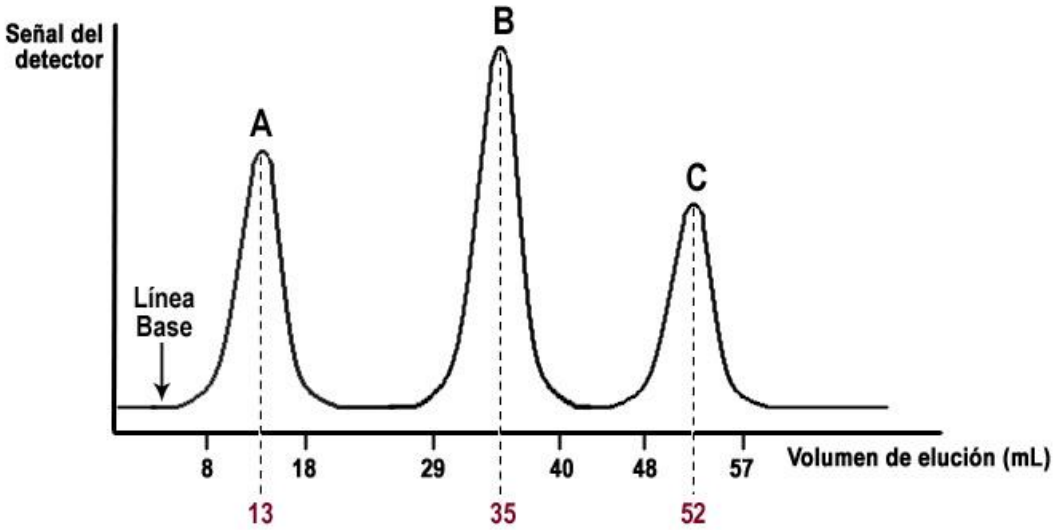


Figura 9.5. Cromatograma de señal vs. volumen de elución

La línea base representa los volúmenes de fase móvil que no contienen soluto (pues la señal del detector es mínima), mientras que cada uno de los picos que aparecen en el cromatograma (A, B y C) se corresponden con cada uno de los componentes d separados en la columna cromatográfica. En este caso, el componente A está contenido en los tubos del 8 al 18, el componente B en el intervalo del 29 al 40 y el componente C en los tubos del 48 al 57. Por otra parte los tubos 13, 35 y 52 son aquellos en que es mayor la concentración de los componentes A, B y C, respectivamente.

Del análisis de este gráfico queda claro además que el componente A es el de menor afinidad por la fase estacionaria y es el primero en eluir, mientras que el C resultó el más fuertemente retenido.

La figura 9.6 muestra un esquema resumen del procedimiento de recogida de los eluatos según los objetivos que se persigan en la separación.

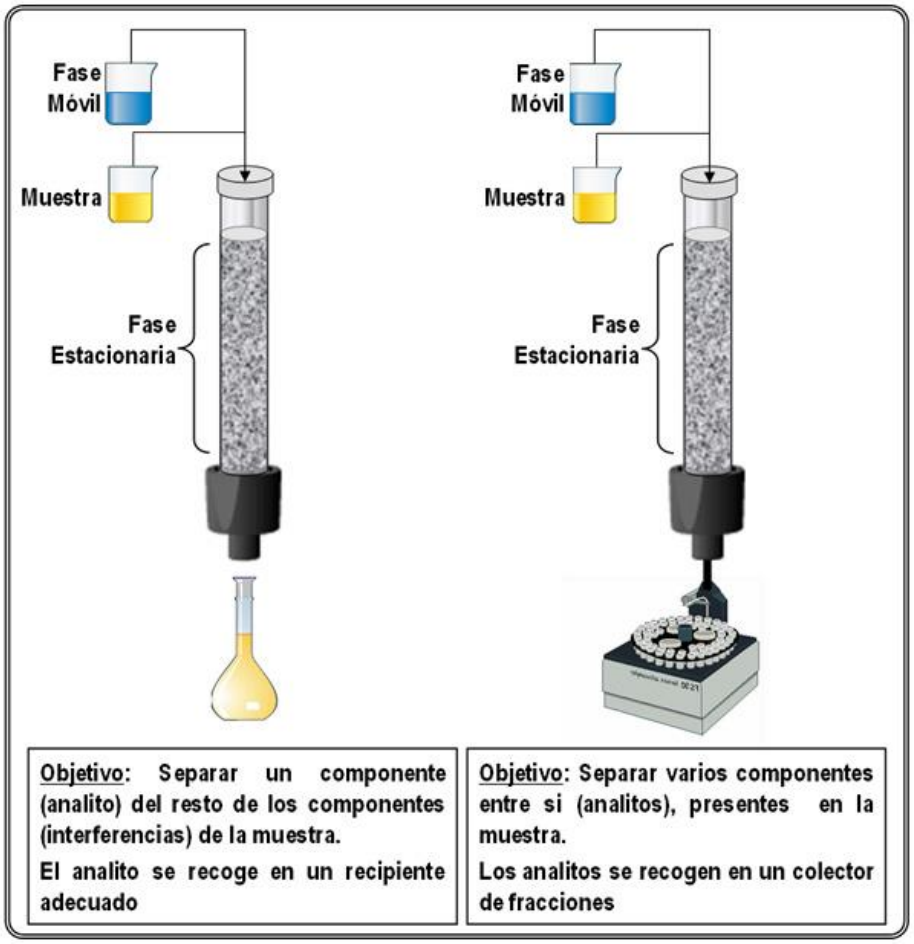


Figura 9.6. Recogida de los eluatos en función de los objetivos analíticos

9.2.5. Identificación y cuantificación de los compuestos separados

En la actualidad las aplicaciones cualitativas y cuantitativas de la cromatografía en columna clásica o convencional son muy limitadas debido al acelerado desarrollo de los métodos automatizados de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y cromatografía de gases, los cuales constituyen poderosas herramientas para separación, identificación y cuantificación de mezclas complejas.

No obstante, existen algunas determinaciones cuantitativas que se realizan por cromatografía en columna clásica. En este caso la cuantificación se realiza en los eluatos obtenidos empleando generalmente métodos espectroscópicos con ayuda de una curva de calibración.

Incluso existen técnicas reportadas de separaciones por cromatografía convencional en los que el componente separado se cuantifica mediante métodos volumétricos. Tal es el caso de la determinación de ácido cítrico en vinos, descrita en el epígrafe 9.2.3. En esta determinación el ácido cítrico eluido y recogido en un matraz aforado es transformado por

oxidación cuidadosa en acetona, la que se separa por destilación y el etanal arrastrado se oxida a ácido acético y se valora sola la acetona por yodometría empleando tiosulfato de sodio como patrón valorante.

9.3. EFICIENCIA DE UNA COLUMNA CROMATOGRÁFICA.

La eficiencia de una columna cromatográfica está dada por su capacidad para lograr la separación de dos o más solutos en un tiempo relativamente corto, en dependencia de la complejidad de la mezcla.

Para el estudio de la eficiencia de una columna tomaremos como punto de partida un sistema en que los eluatos no se recogen en un colector de fracciones como se explicó en el epígrafe 9.4.2., sino que a la salida de la columna está colocado un detector que emite una señal analítica correspondiente a los componentes que van eluyendo, la cual se registra automáticamente en forma de un cromatograma, en este caso de señal vs. tiempo de retención (figura 9.7).

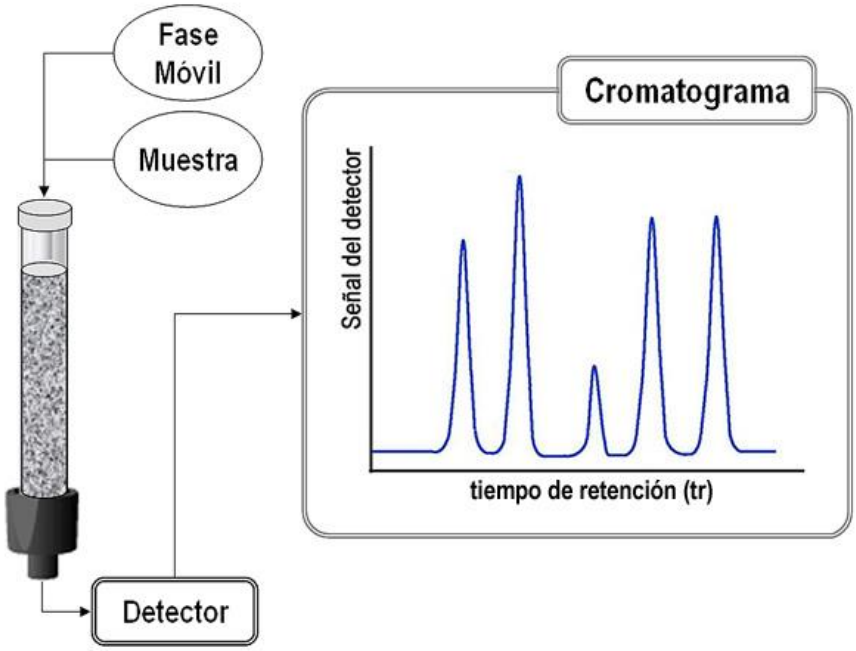


Figura 9.7. Detección en línea de los eluatos

La comprensión de las teorías que explican los fenómenos que afectan la eficiencia de una columna cromatográfica requiere en primer lugar del estudio de dos magnitudes cromatográficas de enorme importancia práctica: el tiempo de retención (*tr*) y la resolución (*R*), las cuales serán analizadas a continuación:

a. Tiempo de retención (*tr*)

El tiempo de retención (*tr*) de un analito dado mide el lapso de tiempo que media entre la introducción de la muestra y el instante en que la respuesta del detector alcanza su valor máximo (figura 9.8).

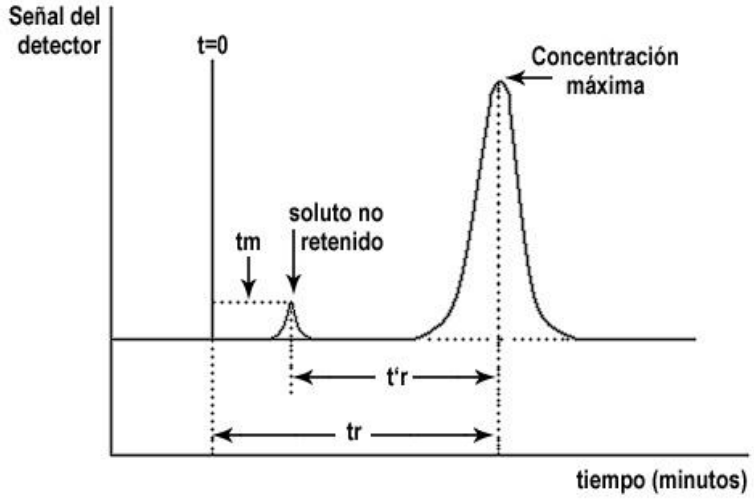


Figura 9.8. Tiempos de retención y otras magnitudes cromatográficas.

Si el tiempo de retención se mide a partir de la señal producida por un analito no retenido por la fase estacionaria, entonces este se llama tiempo de retención reducido (*t'r*). A su vez se llama tiempo muerto (*tm*) al tiempo que demora ese analito no retenido en recorrer la columna cromatográfica y que coincide con el tiempo que requiere la fase móvil para recorrer la distancia desde que se introduce la muestra hasta que esta llega al detector. En consecuencia *tm* es aproximadamente igual al tiempo necesario para que una molécula de la fase móvil pase a lo largo de la columna.

b. Resolución (*R*)

La resolución es la medida con que una columna es capaz de separar a dos solutos con tiempos de retención muy semejantes.

Sean dos solutos 1 y 2 cuyos picos se presentan muy próximos (figura 9.9). La resolución puede calcularse por la expresión:

$$R_{12} = 2\left(\frac{tr_2 - tr_1}{W_2 + W_1}\right)$$

Donde tr_1 y tr_2 son los tiempos de retención de ambos solutos, mientras que W_1 y W_2 representan la anchura en la base de los picos 1 y 2 respectivamente.

Si *R* calculado es mayor de 1.5, los picos están completamente separados (99.7% de resolución), aunque para los trabajos prácticos es suficiente que *R* sea igual o mayor que 1 (resolución de 98%).

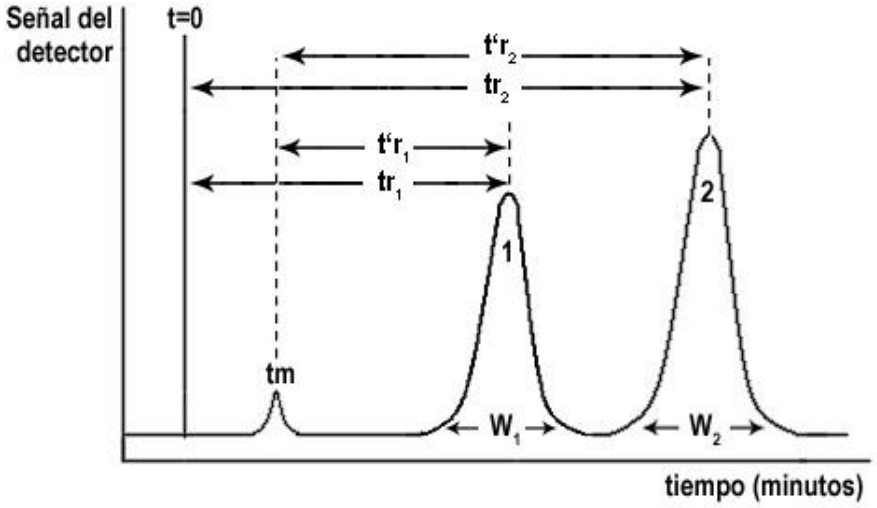


Figura 9.9. Parámetros para el cálculo de la Resolución entre dos picos cromatográficos.

9.3.1. Teorías de la elución cromatográfica

La figura 9.10 muestra las trayectorias de migración de los solutos A y B dentro de una columna cromatográfica en tres etapas: una etapa inicial, una etapa intermedia y una etapa cercana a la elución.

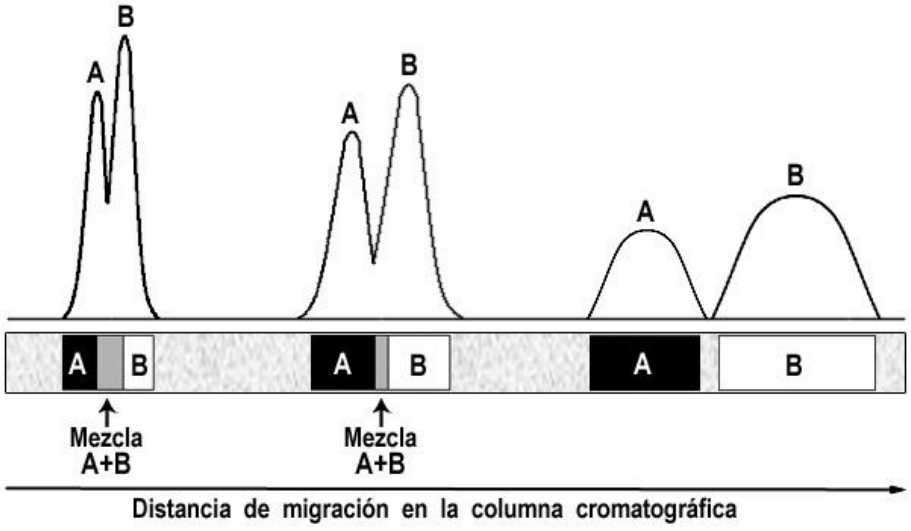


Figura 9.10. Proceso de migración de dos solutos (A y B) dentro de una columna cromatográfica

La interacción del soluto A con la fase estacionaria es mayor que la de B, en consecuencia A se retrasa durante el proceso de migración dentro de la columna y sería el último en eluir. Es evidente que el movimiento hacia abajo en la columna aumenta la distancia entre los dos picos. Al mismo tiempo sin embargo tiene lugar un ensanchamiento de ambos picos (llamado también ensanchamiento de banda o de zona) lo que disminuye la eficiencia de la columna como dispositivo de separación.

El ensanchamiento de zona es inevitable; sin embargo, afortunadamente este proceso es más lento que la separación de los picos. De esta forma, es posible una separación neta de ambas especies siempre que la columna posea una longitud suficiente.

Resulta evidente que las teorías que intenten sustentar el proceso de separación cromatográfico deben ser capaz de explicar dos fenómenos: primero, la velocidad de migración de los solutos en la columna cromatográfica y segundo, la velocidad de ensanchamiento de los picos durante la migración. En este sentido son válidas dos teorías que en la actualidad se complementan: la teoría de los platos teóricos y la teoría cinética.

9.3.1.1. Teoría de los platos teóricos

La teoría de los platos teóricos es la teoría original de la cromatografía y fue desarrollada por Martin y Synge en 1941. Esta teoría considera que el empaque de una columna cromatográfica está compuesto por una serie de estrechas capas horizontales llamadas platos teóricos (que no existen como una entidad física en la columna). Se supone que en cada plato tiene lugar el equilibrio del soluto entre la fase móvil y la fase estacionaria. El movimiento del soluto y el disolvente se considera entonces como una serie de transferencias sucesivas de un plato al siguiente (figura 9.11).

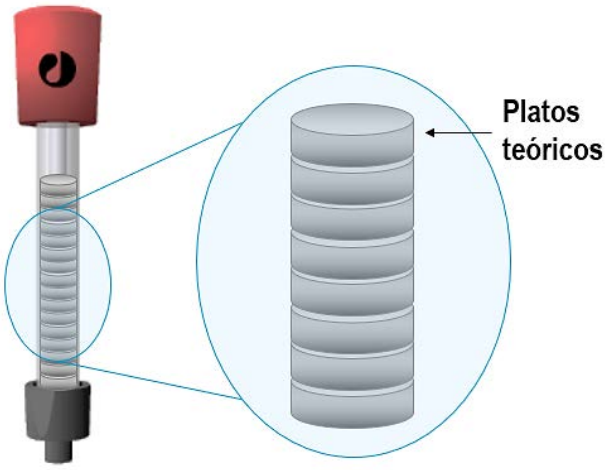


Figura 9.11. Representación esquemática de los platos teóricos

La eficiencia de una columna cromatográfica será mayor en la medida que aumenta el número de platos teóricos, pues aumentará también el número de equilibrios. Puesto que cada soluto establecerá el equilibrio a diferente velocidad, en función de su constante de distribución entre ambas fases ello condiciona que a mayor número de posibles equilibrios, mejor será la separación entre los solutos que forman la mezcla pues se moverán a diferente velocidad.

En consecuencia, el número de platos teóricos (N) se utiliza como una medida de la eficiencia de una columna cromatográfica. Un segundo término, la altura equivalente de un plato teórico (H) también sirve para este fin. La relación entre ambos parámetros es la siguiente:

$$N = \frac{L}{H}$$

donde L es la longitud del empaque de la columna.

Obviamente *N* y *H* son inversamente proporcionales. Quiere esto decir que si desea aumentar la eficiencia de una columna o sea, aumentar el número de platos teóricos (*N*), esto puede lograrse o bien aumentando la longitud del empaque, o bien disminuyendo la altura equivalente de un plato teórico.

El número de platos teóricos de una columna puede calcularse experimentalmente con los datos de un pico cromatográfico, según:

$$N = 16\left(\frac{tr}{W}\right)^2$$

donde *tr* es el tiempo de retención del soluto y *W* es la anchura del pico en la base.

La teoría de los platos teóricos fue capaz de describir las velocidades de migración de los solutos de forma cuantitativa; sin embargo, su utilidad resulta limitada porque no logró describir los efectos de las variables responsables del fenómeno de ensanchamiento de banda. Como consecuencia esta teoría fue complementada y enriquecida por la teoría cinética que si pudo explicar el efecto de estas variables.

9.3.1.2. Teoría cinética

La observación de un pico cromatográfico típico pone de manifiesto su semejanza con las curvas gaussianas o curvas de distribución normal, que se obtienen cuando se grafican valores repetidos de una medida en función de su frecuencia de aparición. En consecuencia se obtiene una distribución simétrica de los datos alrededor de un valor medio.

La teoría cinética parte del hecho de que no todas las moléculas del mismo soluto se mueven a igual velocidad dentro del empaque de la columna cromatográfica. Quiere esto decir que, en algunos casos, el tiempo de residencia de las moléculas de un soluto en una fase dada puede ser muy breve pero en otros puede ser muy prolongado. Ciertas moléculas de un soluto viajan más rápidamente que el promedio en virtud de su inclusión accidental en la fase móvil (lo que se traduce en que transitan al próximo plato teórico sin haber alcanzado el equilibrio), mientras otras pueden retardarse debido a que permanecen en la fase estacionaria un tiempo mayor que el promedio. La consecuencia de estos procesos individuales al azar, es una distribución simétrica de las velocidades de migración alrededor de un valor medio que representa el comportamiento promedio de las moléculas del soluto.

Dicho de forma más simple, el fenómeno de ensanchamiento de pico se debe a que no todas las moléculas de un mismo soluto transitan por la columna a la misma velocidad sino que unas se adelantan y otras se atrasan.

La figura 9.12 muestra el efecto perjudicial que tiene el ensanchamiento de banda en la resolución (separación) de los picos en un cromatograma y por ende en la eficiencia del proceso.

Ahora bien, ¿cuáles son las causas que provocan el ensanchamiento de un pico cromatográfico?

Los picos cromatográficos se ensanchan, por lo general, debido a tres procesos bajo control cinético, ellos son: el efecto multipaso, la difusión longitudinal y la transferencia de masa fuera del equilibrio. Las magnitudes de estos efectos están determinadas por variables controlables experimentalmente, tales como la velocidad de flujo, el tamaño de partícula del material de empaque, las velocidades de difusión y el grosor de la fase estacionaria.

A continuación, se explicará en que consiste cada uno de estos fenómenos.

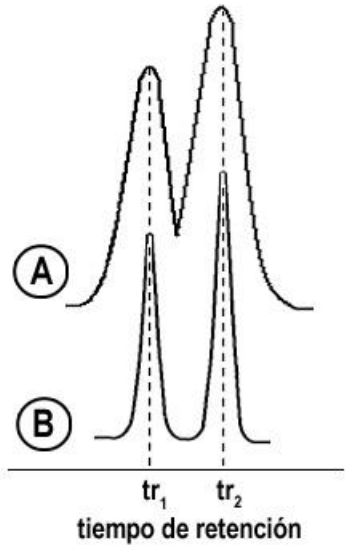


Figura 9.12. Efecto del ensanchamiento de banda sobre la resolución

En el cromatograma A el ensanchamiento de banda produce un solapamiento de los picos afectando la resolución, mientras que en el cromatograma B se obtienen picos estrechos y perfectamente separados. Nótese que los tiempos de retención de los picos 1 y 2 en ambos cromatogramas son idénticos por lo que afectación de la resolución es resultado del ensanchamiento de zona.

A. Efecto multipaso

El efecto multipaso, también llamado efecto del camino múltiple y difusión en remolino, se debe a la gran cantidad de trayectorias que puede encontrar una molécula en su camino a través del empaque de la columna.

En la figura 9.12 se muestran las trayectorias de dos moléculas de un mismo soluto, observándose que las longitudes de estas trayectorias no son iguales. En consecuencia, los tiempos de residencia de ambas moléculas de la misma especie en la columna son también diferentes lo que conduce a que unas se adelanten y otras se atrasen.

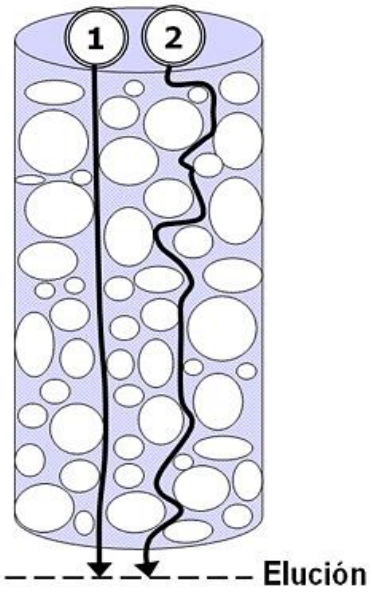


Figura 9.12.
Efecto multipaso

Tal y como se observa en la figura, el efecto multipaso puede relacionarse con el tamaño y la geometría de las partículas del empaque, así como con el grado de compactación del empaquetamiento.

Por ejemplo, parte de las moléculas de un soluto se retrasan en su avance cuando la fase móvil (líquida o gaseosa) tiene que rodear partículas grandes de relleno o cuando en un punto de la columna hay obstrucción debido a partículas muy pequeñas. En ambos casos los movimientos axiales de la fase móvil conducen a un ensanchamiento de la banda del soluto.

Así, el ensanchamiento de bandas debido al efecto multipaso puede disminuirse al mínimo si se empaqueta cuidadosamente la columna conpequeñas partículas esféricas cuyo tamaño varíe dentro de un intervalo limitado, poniendo especial cuidado en evitar la formación de canales abiertos

Una columna empacada de esta forma obligaría a las moléculas de un mismo soluto a moverse por trayectorias similares a similar velocidad, lo que minimiza significativamente el ensanchamiento del pico cromatográfico.

Llama la atención el hecho de que el efecto multipaso es independiente de la velocidad de flujo de la fase móvil.

B. Difusión longitudinal.

La difusión longitudinal se debe a la tendencia de las moléculas de migrar desde la porción central concentrada de una banda hacia regiones más diluidas de arriba y debajo de la zona. Dicho de otro modo, es la tendencia de las moléculas difundir desde zonas de mayor concentración a zonas de menor concentración. Este tipo de difusión puede ocurrir tanto en la fase móvil como en la fase estacionaria y produce un ensanchamiento adicional del pico cromatográfico (figura 9.13).

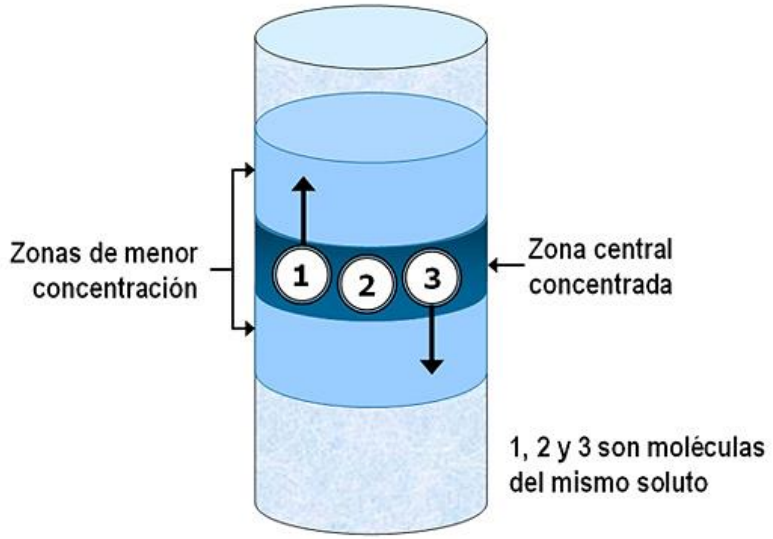


Figura 9.13. Difusión longitudinal

La difusión longitudinal es más importante cuando la fase móvil es un gas debido a que la velocidad de difusión en la fase gaseosa es varios órdenes mayor que en los líquidos. El grado de la magnitud de la difusión aumenta con el tiempo, en consecuencia, el grado de ensanchamiento será mayor mientras menor sea la velocidad de flujo.

En virtud de este comportamiento, el ensanchamiento de banda debido a la difusión longitudinal puede disminuirse aumentando la velocidad de flujo de la fase móvil.

C. Transferencia de masa fuera del equilibrio

La transferencia de masa fuera del equilibrio, también conocido como resistencia a la transferencia de masa, es un fenómeno en virtud del cual las bandas cromatográficas se ensanchan debido a que el flujo de la fase móvil es por lo general tan rápido que los solutos no pueden alcanzar un verdadero equilibrio entre la fase móvil y la fase estacionaria.

Dicho de otro modo, puesto que el establecimiento del equilibrio del soluto entre las fases transcurre con una velocidad finita, se alcanzará completamente solo a velocidades muy bajas de flujo de la fase móvil. La transferencia incompleta de masa contribuye al ensanchamiento de la banda.

Por ejemplo, al frente de la zona en la cual se encuentran el soluto, la fase móvil encuentra fase estacionaria nueva lo que conduce a que ciertas moléculas del soluto se transporten un poco más abajo de la columna sin haber alcanzado el verdadero equilibrio (transitan al siguiente plato teórico sin haber alcanzado el equilibrio en el plato precedente). De la misma forma, detrás de esa zona los solutos de la fase estacionaria encuentran fase móvil nueva y nuevamente la velocidad de transferencia de las moléculas del soluto no es instantánea; entonces la cola de la zona se estira más de lo que ocurriría si el tiempo fuese suficiente para lograr el equilibrio. El efecto neto es el ensanchamiento de la banda del soluto en ambos extremos.

Los efectos de transferencia de masa fuera del equilibrio pueden hacerse menores si se disminuye la velocidad de flujo de la fase móvil debido a que hay más tiempo disponible para que se alcance el equilibrio. Además, es de esperar una aproximación más estrecha al equilibrio si los canales a través de los cuales fluye la fase móvil son estrechos, de modo que las moléculas del soluto no tengan que difundir a lo largo de una distancia grande para alcanzar la fase estacionaria.

Por la misma razón, las capas de líquido inmovilizado en la fase estacionaria (en la cromatografía líquido-líquido y gas-líquido), deben ser lo más delgadas posible. Teóricamente la eficiencia sería máxima con un recubrimiento en forma de capa monomolecular, pero en la práctica esto trae consecuencias adversas ya que por debajo de un cierto espesor de fase líquida se ponen de manifiesto efectos de adsorción del soporte, lo que dificulta y/o hace imposible el análisis.

Cuando la fase estacionaria es sólida (cromatografía líquido-sólido y gas-sólido), la transferencia de masa fuera del equilibrio puede hacerse pequeña usando partículas pequeñas de mucha superficie especifica pero sin grandes poros y grietas.

Finalmente, la aproximación al equilibrio es también mucho mejor a temperaturas elevadas (para el caso de la cromatografía de gases) y utilizando disolventes de baja viscosidad.

Se han obtenido varias ecuaciones que relacionan la eficiencia de una columna cromatográfica con la magnitud de estos tres fenómenos. La primera y más simple de estas ecuaciones se conoce como ecuación de Van Deemter y proporciona una relación aproximada entre la velocidad de flujo (u) y la altura equivalente de un plato teórico (H). Esta ecuación es aplicable tanto en cromatografía líquida como en cromatografía de gases.

$$H = A + \frac{B}{u} + Cu$$

En este caso la magnitud A se relaciona con el efecto multipaso, B es la difusión longitudinal y C es la transferencia de masa fuera del equilibrio.

En forma más desarrollada, esta ecuación puede plantearse como:

$$H = 2\,\lambda\; d_p + \frac{2\,\gamma\, D_g}{u} + \frac{8}{\pi}\cdot\frac{K}{(1+K)^2}\cdot\frac{{d_f}^2}{D_L}\cdot u$$

en donde:

λ es el llamado coeficiente de tortuosidad y depende de la uniformidad del relleno y de la forma en que se llenó la columna.

d_p es el diámetro promedio de las partículas de relleno.

D_g es el coeficiente de difusión del soluto en la fase líquida.

u es la velocidad lineal media de la fase móvil.

γ es el factor de laberinto de los canales o factor de obstrucción.

K es el factor de retención.

d_f es el espesor promedio de la película de fase líquida que recubre el soporte.

Con la excepción de u, los demás factores quedan fijados cuando se selecciona: el tipo de soporte y fase líquida, el porcentaje de ésta última, la forma en que se llenó la columna y el tipo de fase móvil. De cualquier modo, de las expresiones analizadas se desprende que la eficiencia de la columna cromatográfica aumenta a medida que se hace mínimo *A, B y C,* por cuanto también se minimiza la altura equivalente de un plato teórico lo que conduce al incremento del número de platos teóricos y con ello al establecimiento de un mayor número de equilibrios del soluto entre ambas fases.

En la figura 9.14 se muestra la contribución de cada término de la ecuación simplificada de Van Deemter en función de la velocidad de la fase móvil, así como su efecto neto.

Del análisis de este gráfico resulta claro que es preciso llegar a un compromiso entre los factores que afectan la eficiencia cromatográfica, expresada por la ecuación de Van Deemter. Así hemos visto que la altura del plato teórico *H* crece a bajas velocidades de la fase móvil debido a difusión, mientras que ocurre lo mismo a elevadas velocidades por falta del establecimiento del equilibrio. Entre estos dos extremos hay un punto que corresponde al flujo óptimo. En la práctica se trabaja dentro de una zona bastante amplia, por cierto, aunque es siempre recomendable conocer cuáles son los límites dentro de los que es factible situar la velocidad de la fase móvil en el trabajo diario.

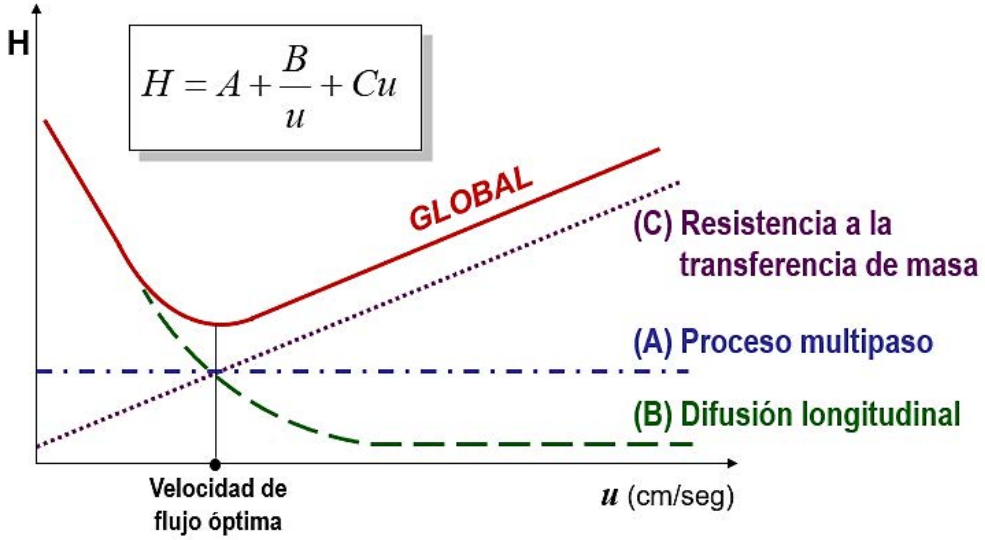


Figura 9.14. Solución gráfica de la ecuación de Van Deemter.

9.3.2. Otros parámetros cromatográficos de interés

a. Factor de capacidad (*k'*).

El factor de capacidad describe las velocidades de migración de los analitos en la columna y está relacionado con la constante de distribución (*Kc*) de un soluto entre 2 fases, es decir la relación de la concentración de un analito A en la fase estacionaria, respecto al valor correspondiente en la fase móvil.

$$K_C = \left[\frac{A_{FE}}{A_{FM}} \right]$$

donde *FE* es la fase estacionaria y *FM* es la fase móvil

Esta expresión se puede transformar como se indica:

$$K_C = \frac{\frac{w_E}{V_E}}{\frac{w_M}{V_M}} = \frac{w_E}{w_M} \cdot \frac{V_M}{V_S}$$

donde:

w_E = masa del analito en la fase estacionaria

V_E = volumen de la fase estacionaria

w_M = masa del analito en la fase móvil

V_M = volumen de la fase móvil

Se llama entonces factor de capacidad (*k'*) a la relación de las masas del analito en la fase estacionaria y la fase móvil.

$$k' = \frac{w_E}{w_M}$$

El factor de capacidad puede expresarse también en función de la relación del tiempo de permanencia del analito en la fase estacionaria (*t'r*) respecto al valor correspondiente en la fase móvil (*tm*), es decir:

$$k' = \frac{tiempo\ que\ permanece\ el\ analito\ en\ la\ fase\ estacionaria}{tiempo\ que\ permanece\ el\ analito\ en\ la\ fase\ móvil}$$

o lo que es l mismo:

$$k' = \frac{t'r}{tm}$$

y se sabe que *t'r*= *tr* – *tm*, entonces k' puede expresarse:

$$k' = \frac{tr - tm}{tm}$$

En resumen el factor de capacidad (*k'*) expresa la interacción del soluto con la fase estacionaria. Obviamente a mayor *k'*, mayor será el tiempo de retención (*tr*) del soluto.

En la cromatografía de partición, la cantidad de fase estacionaria es directamente proporcional a *k'*. En la cromatografía de adsorción la proporcionalidad va ligada a la superficie del adsorbente, mientras que en intercambio iónico, la correspondencia es con el número especies ionizadas.

b. Selectividad (α)

La selectividad expresa la retención relativa entre los máximos de dos picos adyacentes y puede calcularse mediante la expresión:

$$\alpha = \frac{t' r_2}{t' r_1}$$

La determinación de los tiempos que permanecen dos componentes en la fase estacionaria, evalúa las magnitudes de sus interacciones y se establece la relación de separación. La selectividad es conocida como eficiencia de la fase estacionaria y en la medida que se aleje más del valor 1 mejor será la separación entre los picos, es decir la fase estacionaria es más selectiva mientras mayor es el valor de α.

Una vez conocidas estas dos nuevas magnitudes se puede plantear la ecuación maestra de la resolución como:

$$R = \frac{\sqrt{N}}{4}\left(\frac{k'}{1+k'}\right)\left(\frac{\alpha-1}{\alpha}\right)$$

y de la cual pueden extraerse las siguientes conclusiones:

- El término $\frac{\sqrt{N}}{4}$ se relaciona directamente con la eficiencia, mientras que $\left(\frac{k'}{1+k'}\right)$ y $\left(\frac{\alpha-1}{\alpha}\right)$ están ligados a la retención y la selectividad, respectivamente.
- Para tener buenas separaciones, se necesita que *k´* sea mayor de 2. Sin embargo, un valor mayor de 6, sólo aumenta el tiempo del análisis sin mejorar la resolución.
- Al graficar *R vs.* α, se obtiene una gráfica asintótica por arriba de 6. Debido a que lo más usual es trabajar en la zona cercana a α= 1, la resolución mejora notablemente cuando se incrementa de 1 a 6 el valor de α.
- Es necesario cambiar en varios órdenes de magnitud el valor de *N* para tener una buena resolución. Sólo se debe mejorar *N* con sistemas que posean valores pequeños de *H*. Únicamente en casos especiales, se debe trabajar con columnas muy largas, que producen análisis lentos.

En resumen, puede plantearse que la eficiencia de una columna cromatográfica está condicionada por los siguientes factores:

1. Longitud del empaque: A mayor longitud, mayor número de platos teóricos y mayor eficiencia, pero los análisis consumen mayor tiempo
2. Tamaño y geometría de las partículas del empaque: A menor tamaño de partícula y mayor homogeneidad y grado de compactación, menor efecto multipaso, y mayor eficiencia.
3. Diámetro interno del empaque: A menor diámetro, menor espesor de la capa líquida que rodea a fase estacionaria, menor resistencia a la transferencia de masa y mayor eficiencia.

4. Velocidad de flujo: Existe una velocidad de flujo óptima, aunque no siempre es necesario trabajar a este valor óptimo. En la práctica la velocidad de flujo se determina empíricamente.
5. Naturaleza de la fase móvil y la fase estacionaria: Ambas influyen en el factor de capacidad y en la selectividad, de ahí la importancia de su adecuada selección según los objetivos analíticos que se persigan y las características de los solutos que se desean separar así como de la matriz en que se encuentren.
6. Régimen de elución: Se emplean regímenes isocráticos o de gradiente en función de la complejidad de la mezcla expresada tanto el número de componentes como en sus coeficientes de distribución.

La cromatografía líquida en columna convencional no pudo en su momento satisfacer todas estas exigencias. El tamaño grande e irregular de las partículas de la fase estacionaria, el gran consumo de solventes y matrices, los largos tiempos de análisis así como la pobre eficiencia en la separación de mezclas complejos, impusieron a la cromatografía convencional un reto que solo pudo vencerse con el desarrollo de la electrónica y de nuevos materiales. Así, la cromatografía líquida en columna convencional evolucionó al potente sistema automatizado que hoy constituye la cromatografía líquida de alta resolución, a la cual dedicaremos el siguiente capítulo.

Trabajo Independiente

1. *Consulte el apéndice C-3, en el que aparece un resumen de los aspectos relacionados con la eficiencia de una columna cromatográfica, tratados en el presente capítulo.*
2. *Resuelva los ejercicios 10, 11 y 12 que aparecen en el* ***Capítulo 14 / epígrafe 14.1. Ejercicios propuestos****.*

BIBLIOGRAFÍA.

1. Dierksmeier, G. (2005). Métodos cromatográficos. Editorial Científico Técnica. Impreso por Impresol Ediciones Ltda. Bogotá, Colombia.
2. Martin, A. y Synge, R. (1941). Biochem. J., 35, 1358.
3. Sierra, M; Gómez, S; Morante, S; Pérez, D; Sanchez, A; Gañan, J. (2015). Análisis Instrumental. Experiencia de Innovación Docente en la URJC. Ed. Dykinson. Madrid
4. Skoog, D; Holler, J; Crouch, S. (2008). Principios de análisis instrumental. 6ta ed. Cengage Learning Editores.
5. Stock, R. y Rice, C. (1966). Chromatographic Methods. Ed. Chapman and Hall. LTD and Sciense Paperbacks Second Edition Liverpool.

10 Cromatografía líquida de alta resolución

10.1. GENERALIDADES

El éxito alcanzado por la cromatografía gaseosa y el desarrollo logrado en la construcción de equipos, condujo necesariamente a la cromatografía líquida instrumental moderno, cuya primera versión se remonta a comienzos de la década de 1960.

La cromatografía líquida de alta resolución, tal como la conocemos hoy y que universalmente se abrevia con las siglas HPLC (del inglés *High Performance Liquid Chromatography*), vino a llenar el vacío, no abarcado por la cromatografía gaseosa.

En efecto, esta nueva rama analítica se ocupa con preferencia, aunque no exclusivamente, de aquellos compuestos con presión de vapor baja o termolábiles que, o no se pueden cromatografiar directamente mediante la cromatografía gaseosa o requieren de un tratamiento químico previo (derivatización), en ocasiones engorroso, consumidor de tiempo o caro.

El éxito y la popularidad alcanzada por la cromatografía líquida desde su utilización comercial a partir de la década de 1970 no tienen precedentes. En parte esto se debió a que la cromatografía gaseosa ya había abierto el camino, se había alcanzado un nivel considerable en la teoría cromatográfica y además, la construcción de equipos sofisticados era cosa rutinaria en muchos países.

En menos de una década, la HPLC abarcó campos como el de los medicamentos, los polímeros sintéticos y biológicos, los aminoácidos, azúcares y compuestos inorgánicos, por solo mencionar aquellos de acceso difícil a la cromatografía gaseosa.

En la actualidad la cromatografía gaseosa y la HPLC abarcan una gran parte de la actividad analítica que se realiza a nivel mundial. La primera, apoyada en el desarrollo de fases estacionarias nuevas, puede contar en el presente con una fase estacionaria adecuada a cada problema analítico particular. Además, el desarrollo de las columnas capilares y la introducción de la sílice fundida en la construcción de éstas le han abierto un campo extraordinario a la cromatografía gaseosa.

La HPLC, especialmente en su modalidad de fase reversa (RP del inglés Reverse Phase) que es la que más se utiliza y se apoya en un reducido número de rellenos cromatográficos. La gran aplicabilidad del método se basa en que la fase móvil interviene de forma decisiva en el proceso de separación cromatográfica. Prácticamente se puede obtener una fase móvil para cada problema analítico,

variando cualitativamente (la composición) o cuantitativamente (la proporción de los componentes) de ella.

10.2. Descripción del proceso cromatográfico

De forma muy simplificada puede decirse que el proceso consiste en bombear a presión elevada un solvente o sistema de solventes a través de una tubería capilar, por lo general de acero inoxidable. Este líquido llega a una válvula que permite la introducción de la muestra que se desea analizar.

La muestra, casi siempre una solución, se introduce mediante una jeringuilla en un segmento de tubo capilar de volumen exacto y conocido. Accionando una válvula se logra que la solución de la muestra se incorpore rápidamente al torrente de fase móvil. Entre la válvula de introducción de muestras y la columna cromatográfica, se sitúa generalmente una precolumna. En los primeros cromatógrafos líquidos, esta precolumna tenía como función garantizar que la fase móvil que salía de ella, se encontrara completamente saturada precisamente con la fase estacionaria usada en la columna cromatográfica. De este modo se evitaba que la fase móvil, a su paso a través de la columna, arrastrara consigo la fase cromatográficamente importante en el proceso.

Con la introducción de rellenos de fase enlazada y la reducción drástica en el tamaño de partículas de estos, cambió la función de la precolumna, pero no su importancia. En efecto, en la actualidad, al usarse rellenos de fase enlazada, no se requiere la precolumna saturadora, pero la reducción del tamaño de partículas hace que las columnas estén más expuestas al deterioro, a la obstrucción por la materia en suspensión que puede acompañar a la muestra, a las moléculas de peso molecular elevado que como impurezas pueden introducirse con la muestra e incluso a los solventes usados como fase móvil. La precolumna es pues una barrera, un filtro protector adicional que alarga la vida útil de la columna.

A continuación de la precolumna se sitúa la columna cromatográfica, conectada a la primera mediante una tubería capilar. En su modalidad clásica la columna cromatográfica es un tubo de acero inoxidable (relleno con la fase estacionaria) de 1 *mm* a 4 *mm* de diámetro interno y longitud variable, según la necesidad analítica, pero por lo general inferior a 50 *cm*.

En la columna ocurre la separación cromatográfica de los componentes de la muestra. El mecanismo de separación depende de la naturaleza de la fase móvil y de la fase estacionaria y en esencia, la separación está determinada por las diferencias en afinidad de los analitos por ambas fases.

A la salida de la columna se encuentra conectado el detector. En la actualidad se usa un número reducido de detectores entre ellos: el refractométrico, el detector espectrofotométrico, el detector electroquímico, el de fluorescencia y el de conductividad. Se han desarrollado otros detectores, pero no han sido tan utilizados comercialmente como los mencionados.

La señal producida por el detector, previamente amplificada, se recibe en un registrador potenciométrico donde se origina el cromatograma correspondiente. En la actualidad, la señal puede procesarse mediante un software especializado con las ventajas inherentes que brindan las Tecnologías de la Información y las Comunicaciones (TICs). Aunque no es una parte esencial del sistema de cromatografía líquida, es posible también acoplar a la salida del detector, un colector de fracciones, con el que se puede obtener separadamente las eluciones correspondientes a un pico o un conjunto de picos según se requiera para un uso posterior.

En la figura 10.1 se presenta un esquema correspondiente a un sistema cromatográfico simple como el que se ha descrito en los párrafos precedentes.

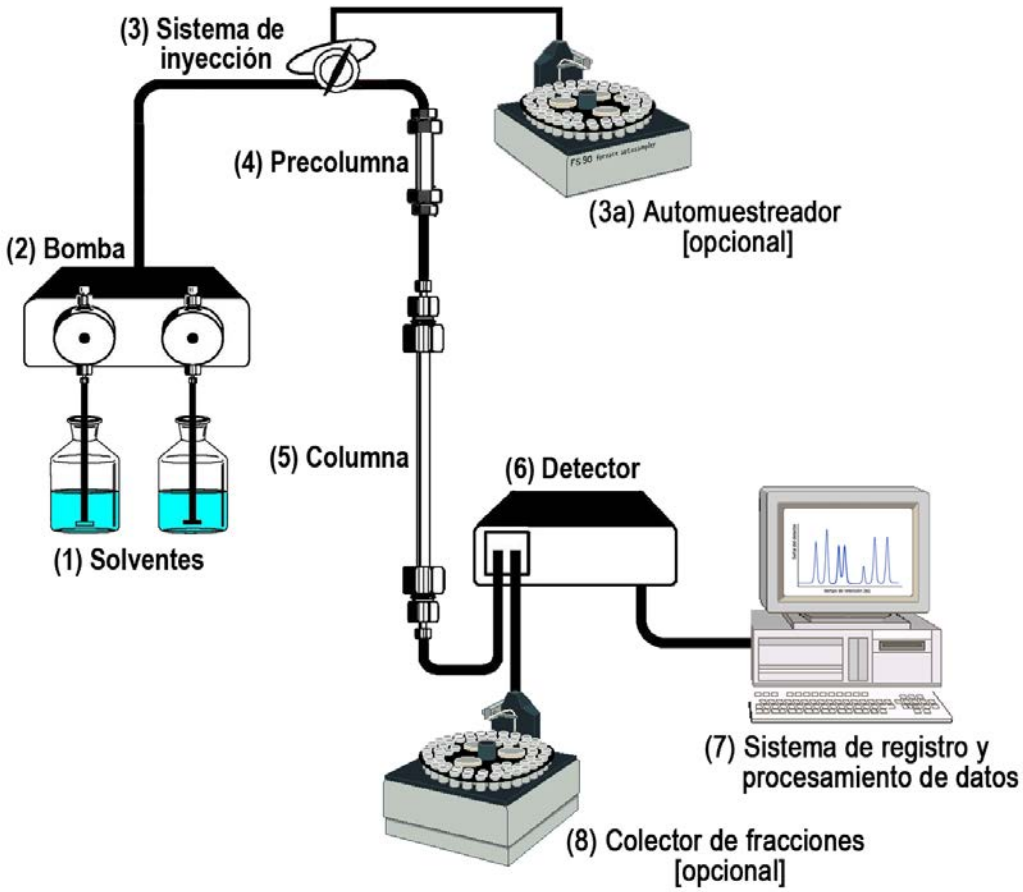


Figura 10.1. Esquema de un sistema cromatográfico HPLC

10.3. Los componentes del sistema cromatográfico

En los párrafos siguientes se describe las partes constitutivas de un sistema de cromatografía líquida de alta eficiencia. Siempre que sea posible se dará los parámetros característicos o usados comercialmente.

10.3.1. La fase móvil

La fase móvil está constituida por un solvente, una solución o un sistema de solventes, acorde al tipo de cromatografía y a la muestra que se pretenda analizar.

La fase móvil ha de ser compatible con el detector que se requiera para llevar a cabo la determinación.

Por lo general, la fase móvil se encuentra en recipientes de un 1 litro de capacidad, situados por encima de los demás constituyentes del sistema cromatográfico. Mediante tubería plástica resistente a solventes de 1 *mm* a 2 *mm* de diámetro interno, la fase móvil llega a la bomba.

Por lo general en el extremo del tubo de toma de solventes se sitúa un filtro tubular que impide la entrada de partículas a la bomba que sean superiores a 0,2 micrómetros.

Hay algunos requisitos que deben satisfacer los solventes usables en cromatografía líquida de alta eficiencia, tanto en sus propiedades físicas como químicas.

Propiedades físicas

Las propiedades físicas más importantes de los solventes son: índice de refracción; absorción en el ultravioleta; viscosidad y polaridad. (5)

- **Índice de refracción**. Solo es necesario tenerlo en cuenta cuando se trabaja con un detector refractométrico. Es requisito en este caso que el solvente seleccionado tenga un índice de refracción lo más diferente posible al de los solutos constitutivos de la muestra, de lo contrario, la sensibilidad de la determinación será baja.
- **Absorción en el ultravioleta**. Cuando se trabaja con un detector espectrofotométrico en el rango UV, es imprescindible conocer la longitud de onda límite de uso de cada solvente.
- **Viscosidad**. Esta propiedad es importantísima puesto que ella se opone al flujo del solvente a través de la columna. Como se sabe, en HPLC la fase móvil se hace pasar a presión elevada a través de una columna rellena con partículas muy pequeñas. Mientras menor sea la viscosidad de un solvente a la temperatura de la columna, menor será la presión necesaria para lograr la velocidad lineal (o el flujo) requerido para el análisis de una muestra.
- **Polaridad**. Esta propiedad siempre es necesario conocerla tanto cuando se trabaja en cromatografía de absorción como cuando se utiliza otros tipos de cromatografía.

En la tabla 10.1 se resume las propiedades físicas de interés de algunos solventes de uso común en HPLC.

Tabla 10.1.

Propiedades físicas de interés de algunos solventes de gran uso en HPLC

Solvente	Viscosidad cp (20ºC)	λ límite nm 20ºC	Índice de Refracción 20ºC
N - pentano	0,23	200	1,358
N - hexano	0,42	200	1,388
Ciclohexano	0,98	210	1,426
Éter etílico	0,23	220	1,353
Diclorometano	0,44	250	1,424
Acetato de etilo	0,45	260	1,37
Acetonitrilo	0,37	210	1,344
Isopropanol	2,39	205	1,375
Etanol	1,2	200	1,361
Metanol	0,6	200	1,329
Tetrahidrofurano	0,51	210	1,404
Agua	1,00	180	1,333

Es preciso señalar que las propiedades físicas de un sistema de solventes dependen de la magnitud correspondiente de cada constituyente y de la proporción de estos en el sistema.

Por ejemplo, la viscosidad del sistema agua: metanol 1:1 es aproximadamente:

$$\frac{1{,}0\,cp + 0{,}6\,cp}{2} = 0{,}8\,cp$$

En donde 1,0 cp y 0,6cp son las viscosidades respectivas del agua y el metanol.

Pureza de los solventes

La pureza de los solventes es un requisito elemental si se tiene en cuenta que la HPLC alcanza límites de detección y de determinación en el rango de los nanogramos a los picogramos. Desde el punto de vista químico, un solvente puro para análisis, destilado en equipo de vidrio, está apto para usarlo en HPLC siempre que durante esta etapa purificadora se excluya la incorporación de polvo. Sin embargo, a pesar de las medidas que se tomen en este sentido, se recomienda siempre, antes de usar un solvente, pasarlo a través de un filtro que retenga partículas en suspensión superiores a 0,2 micrómetros – 0,4 micrómetros. De esta forma se obtiene un solvente adecuado para la mayoría de los trabajos en HPLC.

Una impureza sutil que acompaña a todos los solventes es la presencia en ellos de gases disueltos, fundamentalmente oxígeno y nitrógeno. Esto origina burbujas gaseosas en la bomba, en el dispositivo de mezclado y en el detector. Además, con el transcurso del tiempo, el oxígeno afecta algunos constituyentes del sistema cromatográfico.

La formación de burbujas en la bomba puede producir cambios en el flujo de trabajo. Si las burbujas se localizan en el dispositivo de mezclado, originan cambios notables en la composición del sistema de solventes, tanto si se está trabajando con composición constante (isocráticamente) o si se opera con un gradiente de concentración.

Pero donde más frecuentemente se forman las burbujas es en el detector, puesto que en él la presión es baja (a la salida del detector la fase móvil está a presión atmosférica). El aire que se mantiene disuelto en el solvente cuando este último está a presión, se libera entonces al llegar al detector, originando las burbujas. Estas burbujas producen ruido y deriva considerable y una inestabilidad tal que impiden trabajar cuando ellas se forman.

También se produce burbujas cuando se opera en el modo de operación llamado gradiente de concentración con solventes en los cuales la solubilidad del aire en ellos es diferente.

Estas razones son suficientes para comprender la necesidad de desgasificar los solventes que se usan en HPLC.

Hay diversos métodos para desgasificar solventes, algunos ya usados desde los comienzos de la técnica de la cromatografía líquida moderna. Entre ellos se encuentran la desgasificación por burbujeo de Helio; mediante aplicación de vacío; por reflujo o con la utilización de un baño ultrasónico.

- **Desgasificación mediante corriente de Helio**

  Debido a que el He es mucho menos soluble en los solventes que el Nitrógeno y el Oxígeno, se utiliza para desplazar a éstos. Para ellos se introduce una corriente de Helio en la masa del solvente mediante un tubo provisto en su extremo de una placa de vidrio aglomerado. De esta forma, la salida está constituida por burbujas pequeñas distribuidas en el solvente. En la práctica es suficiente un flujo de 60 *ml* - 80 *ml* de He/min durante 10 minutos. Después el flujo de este gas se puede reducir a unos 20 *ml/min* para mantener desgasificado el solvente mientras dura el trabajo. Esto es importante, pues la redisolución del aire hasta alcanzar el nivel previo a la desgasificación se produce entre 30 minutos y 60 minutos, en dependencia del solvente y la temperatura de éste.

  Para la mayoría de los solventes la eficiencia de la desgasificación con He es superior a 80 %. El agua es más difícil de desgasificar y nunca se alcanza la eficiencia señalada. Aunque el método es satisfactorio, su costo elevado limita su uso.

- **La utilización del vacío**

  La desgasificación mediante vacío se utiliza cuando no se dispone de otros recursos. Consiste simplemente en mantener a presión reducida al solvente durante unos 15 minutos. La eficiencia de la desgasificación es comparable a

la del He. El agua es una excepción, pues con el vacío apenas se alcanza una eficiencia de 30 % en el tiempo señalado.

- **El reflujo**

  Este es el método más efectivo en lo que respecta a rapidez y eficiencia. Entre 10 minutos y 15 minutos son necesarios para expulsar completamente todo el gas disuelto en el solvente cuando este se refluja en un balón provisto de un condensador convencional. Si se mantiene después el solvente a una temperatura cercana a su punto de ebullición, la reincorporación del aire es despreciable. Sin embargo, esto ocasiona una atmósfera nociva y peligrosa en el área de trabajo. En nuestro Laboratorio se ha utilizado con éxito por más de 15 años una combinación de vacío y temperatura que mantiene desgasificada la fase móvil mientras se usa el cromatógrafo, sin los inconvenientes mencionados.

- **El baño ultrasónico**

  La introducción del frasco del solvente en un baño ultrasónico produce una desgasificación moderada, con una eficiencia por lo general inferior a la de los demás métodos descritos. El procedimiento es sin embargo cómodo, barato y no peligroso.

- **Desgasificadores comerciales**

  Actualmente se oferta en el mercado equipos desgasificadores que funcionan de forma segura, eficiente y sin contaminar el área de trabajo. Esos equipos permiten la desgasificación simultánea de varias fases móviles. La eficiencia de la desgasificación es independiente del flujo de la fase móvil que se requiera y tampoco depende de la composición de esta.

  Finalmente es preciso señalar que la desgasificación es más difícil y menos eficiente en aquellos solventes con polaridad grande (por ejemplo, el agua).

10.3.2. La bomba

La bomba es una parte fundamental del sistema cromatográfico. Su función es la de extraer el solvente o sistema de solventes (fase móvil) de su reservorio e impulsarlo a altas presiones a través del sistema cromatográfico, garantizando la velocidad de flujo.

Puede decirse que el desarrollo alcanzado en la construcción de esta parte del cromatógrafo líquido, ha sido decisiva en el avance de la HPLC. Esto resulta evidente si se analiza los requisitos de una bomba usable en esta técnica. Cuando se trata de columnas analíticas convencionales (diámetros internos entre 2 *mm* y 4 *mm*) la bomba debe entregar un flujo de solvente constante y exacto, en el rango de 0,5 *ml/min* a 10 *ml/min*. La presión de entrega de la bomba ha de ser regulable entre 10 bar y 500 bar (146 psi y 7300 psi).

La bomba ha de trabajar de forma continua, sin interrupciones, por periodos prolongados de tiempo. El material constitutivo de la bomba, especialmente las

partes en contacto con el solvente, deben ser capaces de resistir el ataque de las fases móviles agresivas (como las usadas en separaciones iónicas).

En la actualidad, la mayoría de los fabricantes oferta bombas reciprocantes de dos pistones, que entregan un flujo de fase móvil, prácticamente sin pulsaciones.

Las bombas utilizadas con columnas rellenas de diámetros internos menores o iguales a 1 *mm* deben entregar entre 5 *microlitros/min* y 500 *microlitros/min* en el mismo rango de presiones señalado anteriormente.

Cuando se trabaja con columnas vacías, por ejemplo, de sílice fundida, el rango de trabajo es aún menor, del orden de 0,1 *microlitros/min* – 10 *microlitros/min*. Las bombas usadas en este rango son por lo general del tipo de jeringuilla (un émbolo que desplaza el volumen requerido a la presión que garantice el flujo necesario.

En HPLC puede trabajarse con un sistema de elución isocrático (la composición de la fase móvil no varía durante el proceso cromatográfico) o con un sistema de gradiente de elución (la composición de la fase móvil varía paulatinamente durante el proceso cromatográfico).

Cuando se aplica un sistema de gradiente, se utilizan como mínimo dos solventes. El solvente A es débil mientras que el solvente B es fuerte. El porcentaje de este segundo solvente se hace variar en función del tiempo, de modo de lograr la separación requerida.

En sus orígenes, para trabajar con gradiente de elución se requería dos bombas, una para el solvente A y otra para el B.

La salida de ambas bombas se hacía llegar a un dispositivo mezclador desde donde se conducía hacia la columna. La fase móvil iba cambiando en fortaleza acorde a lo requerido para el análisis.

En la actualidad el principio es el mismo, aunque se ha ampliado las posibilidades de formación de gradiente a más de dos componentes, utilizando bombas muy complejas, capaces de asumir por sí solas la formación de la fase móvil requerida. Así, existen hoy en el mercado bombas binarias, terciarias y cuaternarias, capaces de mezclar y controlar la proporción de dos, tres y cuatro solventes, respectivamente.

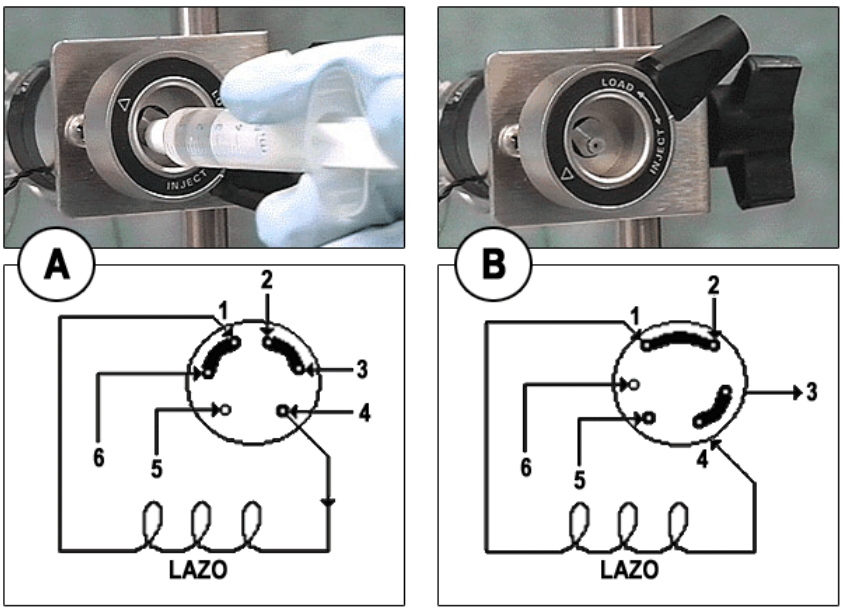
El funcionamiento de las bombas usadas en HPLC está controlado por un microprocesador, lo cual facilita el trabajo y amplía las posibilidades de uso de esta parte del sistema cromatográfico. El microprocesador es especialmente útil cuando se trabaja con gradientes de concentración o con programación de caudal.

En el epígrafe 10.4 se abordará con más detalle los aspectos relacionados con la utilización de sistemas de elución isocrática y de gradiente, así como otros modos de operación con HPLC.

10.3.3. Sistema de inyección o válvula de introducción de muestras.

La válvula de introducción de muestras es un dispositivo que permite la dosificación exacta de volúmenes conocidos de solución o muestra líquida, según el caso, de forma rápida, en el torrente de fase móvil que se encuentra a presión elevada.

La válvula está situada entre la bomba y la precolumna, por lo general próxima a esta última. En posición normal o de carga, la válvula permite el flujo de fase móvil, a la vez que se puede introducir en un tubo calibrado, mediante una jeringuilla, un volumen de muestra exacto y conocido. Estos tubos calibrados o "loops" tienen volúmenes de 1 microlitro a 100 microlitros para la determinación con columnas clásicas, y por debajo de un microlitro cuando se trabaja con columnas de diámetros pequeños o capilares. Con un ligero movimiento de la manecilla de la válvula hacia la posición de introducción, la fase móvil se desvía y circula entonces a través del tubo calibrado, hasta desplazar totalmente el volumen de muestra contenido en este. Después de algunos segundos se retorna la válvula hacia la posición normal o de carga. (figura 10.2)



1. Conexión del lazo / 2. Bomba / 3. Columna / 4. Punto de inyección / 5 y 6. Salida al exterior

Figura 10.2. Válvula de inyección: A) posición de carga, B) introducción a la columna

Por lo general para columnas cromatográficas de diámetros internos entre 4 *mm* y 5 *mm*, el volumen de inyección no debe exceder de 25 microlitros. Así se evita la disminución en los tiempos de retención y en el número de platos teóricos, así como la perdida de resolución.

Un tópico de importancia en HPLC es el relacionado con la naturaleza del solvente que se utiliza para disolver la muestra que se va a inyectar. Es una práctica generalizada disolver la muestra en la fase móvil. Esto en cromatografía

de fase normal no tiene inconvenientes, pues casi todas las muestras son solubles en los solventes orgánicos que se utilizan como fase móvil.

No es así en HPLC – fase reversa por la naturaleza acuosa en muchos casos de la fase móvil. Pero técnicamente es admisible si se tiene en cuenta que en HPLC analítica las concentraciones de trabajo son muy pequeñas por lo que, por muy baja que sea la solubilidad de la muestra en la fase móvil, siempre se logra obtener una solución en ella. Pero si fuera necesario disolver la muestra en otro solvente incluso muy poco soluble en la fase móvil, los resultados de la inyección serían buenos.

Pero la inyección en las columnas capilares, y en las micro, rellenas o no, tiene sus características por lo que es preciso resaltarlas.

Los flujos en las columnas capilares son muy pequeños y los volúmenes de muestras que se inyectan están en el orden de los nanolitros.

Puesto que, en estos casos, aunque se inyecte un volumen tan pequeño, este tiene una proporción grande relativa al flujo de fase móvil típico de estas columnas, la naturaleza del solvente en que se disuelve la muestra influye considerablemente en la calidad del cromatograma.

Así, si el solvente en que se disuelve la muestra es soluble en la fase móvil (o es la propia fase móvil) se reducen los tiempos de retención y en ocasiones se ensanchan algo los picos.

Si por el contrario, este solvente no es soluble en la fase móvil, los picos serán más estrechos que lo esperado, mientras que los tiempos de retención no se alterarán. Hay lo que se llama un efecto de "enfoque" de los componentes de la muestra. Y lo más importante, es posible inyectar volúmenes grandes sin que se altere las características del cromatograma (los *tr* y la resolución serán los mismos).

Para inyectar volúmenes tan pequeños de muestra se requiere válvulas de inyección especiales, que tienen "loops" internos. En este caso el loop clásico se sustituye por una hendidura practicada directamente en el rotor de la válvula de inyección, que tiene el volumen requerido.

Este tipo de dispositivo de inyección se tupe con mucha facilidad aun con muestras limpias, por lo que hay que prestar especial atención a su limpieza sistemática.

En la actualidad existen también los llamados automuestreadores automáticos que son equipos que pueden realizar el proceso de inyección automáticamente sin apenas atención del analista. Estos dispositivos son programables en cuanto al número de muestras a inyectar y los volúmenes que se desean introducir. Así mismo puede programarse el número de inyecciones por vial y el intervalo de tiempo en que se debe realizar la operación. Estos equipos son muy útiles cuando es necesario procesar un gran número de muestras.

Figura 10.3.
Automuestreador automático para HPLC

En la figura 10.3 se presenta la fotografía de un modelo de automuestrador para HPLC.

10.3.4. La precolumna

La precolumna va conectada entre la válvula de introducción de muestras y la columna analítica, en ocasiones unida directamente a ésta. En todos los casos, las precolumnas, además de servir de filtro para evitar la introducción de partículas a la columna, retienen los componentes de la muestra que se adsorberían irreversiblemente en ella, contribuyendo así a prolongar su vida útil.

Por lo general el relleno de las precolumnas es el mismo que el de la columna analítica, en algunos casos con un tamaño de partícula superior. El diámetro de las precolumnas es de unos 4 *mm* y su longitud varia de 5 *mm* hasta 30 *mm* o más. El relleno de las precolumnas puede sustituirse tan pronto se observe saturación (perdida de eficiencia).

10.3.5. La columna cromatográfica

Es la parte del sistema donde se origina la separación de los componentes de la muestra y de la que depende en gran medida la eficiencia del proceso cromatográfico. A continuación, se describe los aspectos fundamentales de las columnas cromatográficas.

10.3.5.1. Características generales

El material más empleado para la fabricación de las columnas de la HPLC, tanto analíticas como preparativas, están constituidas de acero inoxidable por razones de seguridad.

El acero sin embargo tiene limitaciones. En primer lugar, es preciso pulir la pared interna de la columna, pues con paredes rugosas, el empaquetamiento del relleno es deficiente (9). Este tratamiento solo es posible para columnas con 2 *mm* o más de diámetro interno. En las columnas de acero de diámetros menores

o iguales a 2 *mm* ha resultado exitoso recubrirlas interiormente con una capa fina de vidrio.

Otra de las limitaciones del acero es que a pesar de su calidad ocurre siempre la oxidación de la pared interna y las fritas de ambos extremos. Este efecto es mayor si se usa fases móviles pobremente desgasificadas especialmente metanol, acetonitrilo y agua o sus mezclas. Es cierto que, si se oxida una parte de la columna, la capa de óxido formada la protege de ataque posteriores. Pero en ocasiones como se trabaja con medios agresivos, el óxido se disuelve y el acero está expuesto siempre al ataque de la fase móvil, en mayor grado si esta tiene reacción ácida, pero también el metanol y el acetonitrilo reducen la capa de óxido.

No obstante, a pesar de los inconvenientes indicados, las columnas de acero, en especial las de diámetro interno comprendidos entre 2 *mm* y 5 *mm,* son las que más se usan en la actualidad.

Las columnas de vidrio, debidamente protegidas con una estructura o forro metálica exterior, que facilita además su conexión, han encontrado también muchas aplicaciones, debido a la inercia de este material ante un número elevado de fases móviles.

Más recientemente se ha comenzado a utilizar columnas capilares de sílice fundida sin relleno, recubiertas exteriormente de poliamida. Estas columnas resisten presiones altas, en ocasiones superiores a las requeridas para establecer el flujo necesario para las determinaciones analíticas.

Las columnas analíticas en HPLC pueden ser de cuatro tipos, acorde a sus diámetros internos.

- ***Columnas Clásicas.*** Estas columnas tienen diámetros internos entre 2 *mm* y 5 *mm*. Hasta el presente son las columnas más usadas. Para ellas fueron desarrollados los elementos constitutivos del sistema cromatográfico (bomba, inyector, detectores). La longitud de estas columnas, ofertadas comercialmente, se encuentra entre 5 *cm* y 50 *cm*, pero las de mayor uso son las de 25 *cm*.
- ***Columnas SBC.*** Estas columnas tienen diámetros internos entre 0,5 *mm* y 2 mm. Las siglas SBC proceden del inglés (small bore column). El uso de estas columnas brinda algunas ventajas tales como:
  - El gasto de solvente es proporcional al cuadrado del radio, por lo que el ahorro es sustancial.
  - La eficiencia es la misma comparada con las columnas de diámetro mayor, siempre que sea igual en ambas el valor de la velocidad lineal de la fase móvil (μ).
  - En estas columnas se disipa rápida y fácilmente el calor que se genera por bombeo de la fase móvil, especialmente si los flujos son altos.

- La cantidad mínima detectable en igualdad del analito, del detector y los demás parámetros cromatográficos que influyen, es mucho más baja que en las columnas clásicas, puesto que en HPLC hay proporcionalidad entre la masa detectable y el cuadrado del radio de la columna cromatográfica.

No obstante, estos beneficios, como desventajas de las columnas SBC se señalan por lo general las siguientes:

- Requieren un empaquetamiento muy bueno, no siempre alcanzable.
- Las bombas deben trabajar en el rango de 5 microlitros/minuto hasta 500 microlitros/minuto. Estas bombas por lo general son costosas.

- ***Columnas Microbore.*** Estas columnas tienen diámetros internos en el rango de 0,1 *mm* hasta 0,5 *mm*. Comúnmente el material constitutivo de estas columnas es la sílice fundida. Estas columnas se empaquetan por secciones, se acoplan y después se enrollan. En la actualidad el volumen muerto de estos acoplamientos es muy pequeño, por lo general inferior a 70 nanolitros. Puesto que se determina la calidad y eficiencia de cada segmento antes de acoplarlos para lograr la columna, se puede predeterminar el número de estos para obtener una columna de la eficiencia requerida.
- ***Columna Capilar.*** El diámetro interno de estas columnas se encuentra entre 25 micrómetros y 100 micrómetros. Se fabrican casi exclusivamente de sílice fundida, puesto que este material garantiza una buena resistencia mecánica asociada a una flexibilidad aceptable. Resisten presiones del orden de 800 atmósferas (≈ 55 bar), tienen una superficie interna muy lisa (carecen de efecto de pared) además como se sabe, son muy inertes.

  En estas columnas la fase estacionaria se une químicamente a la pared.

  Con el uso de las columnas capilares en HPLC, el consumo de solventes es muy pequeño (en ocasiones hasta 5000 veces menor que con las columnas clásicas). Tienen muy buena resolución, pero la capacidad de carga es pequeña.

  Como el flujo de la fase móvil requerido por estas columnas es muy bajo (del orden de los nanolitros/minuto), se pueden acoplar directamente a detectores de ionización por llama o a espectrómetros de masa.

La forma de las columnas clásicas analíticas y preparativas es recta. Con ello se garantiza un empaquetamiento uniforme del relleno. Dada la pequeña longitud de estas columnas (inferior o igual a 500 mm) la forma recta no crea un problema de ubicación de éstas en el sistema de cromatografía líquida. Incluso se puede colocar estas columnas verticalmente sin ningún problema.

Las columnas rellenas de pequeños diámetros y las capilares sin relleno se pueden enrollar como ya se explicó. Así, una columna de varios metros de longitud ocupa el mismo espacio que una clásica.

La figura 10.4 muestra un esquema y una fotografía de columnas cromatográficas de relleno para HPLC

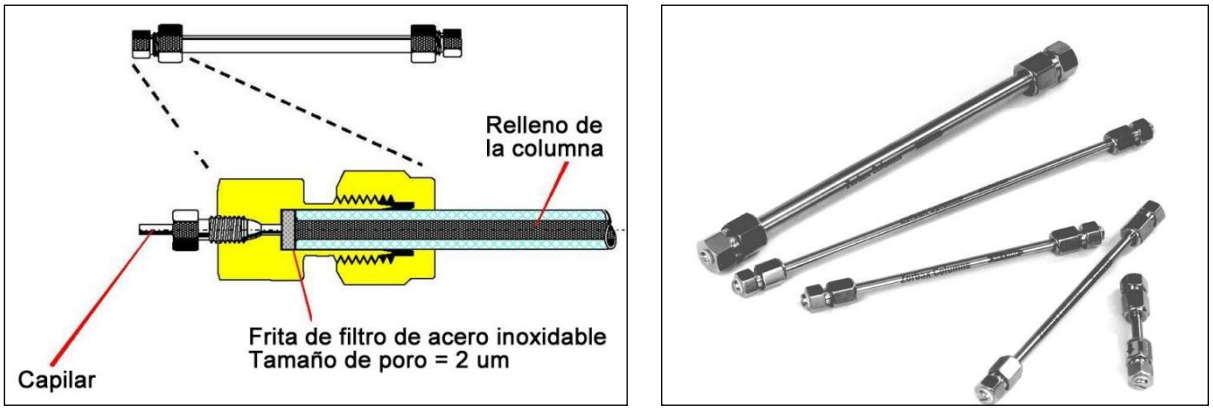


Figura 10.4. Columnas cromatográficas de relleno, de acero inoxidable para HPLC

10.3.5.2. La fase estacionaria

Si se exceptúa las columnas capilares en las cuales la fase estacionaria está unida directamente a la pared interior de éstas, las demás columnas usadas en HPLC, tanto las convencionales como las de diámetro interno pequeño, están rellenas de un material que es en sí la fase estacionaria y el soporte de ésta.

El tamaño y la forma de las partículas de relleno

Las partículas usadas en las columnas analíticas tienen diámetros de 10 micrómetros o inferiores. Las usadas en HPLC preparativa pueden tener hasta 60 micrómetros y en algunos casos algo mayores.

Como ya se ha explicado con anterioridad, a medida que el tamaño de partículas disminuye, la eficiencia del proceso en la HPLC es mayor, en igualdad de los demás parámetros que influyen en ella.

Comercialmente se oferta columnas con tamaños de partículas de 3 micrómetros, 5 micrómetros, 7 micrómetros y 10 micrómetros. Por lo general, a medida que el tamaño es menor, decrece la uniformidad del empaquetamiento. La forma de las partículas es también muy importante. Las hay irregulares, producto de la reducción mecánica del tamaño de partículas mayores. Se obtiene partículas esféricas con condiciones muy controladas. El tamaño de ellas es muy uniforme y el empaquetamiento resultante es mucho más regular, la columna es más permeable a la fase móvil.

La naturaleza del relleno

La base fundamental de casi todos los rellenos en cromatografía líquida es el gel de sílice completamente poroso. Este se utiliza directamente (en la cromatografía líquido – sólido) o como soporte sobre el cual se une químicamente la fase estacionaria. Sin embargo, ha comenzado a usarse rellenos poliméricos, que por sus características encontrarán seguro un uso amplio en HPLC.

En la actualidad se usa tres tipos fundamentales de rellenos: los inorgánicos (representados por el gel de sílice y la alúmina); los constituidos por el gel de sílice modificados químicamente y finalmente aquellos a base de partículas poliméricas. Hay otros, pero sin la importancia de los mencionados. A continuación se describe algunas de las características importantes de estos rellenos.

A. Rellenos inorgánicos

Gel de Sílice. Este material se obtiene en la actualidad con un grado elevado de pureza. Se fabrica en forma de esferas muy uniformes, con una distribución muy estrecha de diámetros de partículas. Los tamaños más frecuentemente usados de estas partículas son de 10 μm, 5 μm y 3 μm. Cada una de ellas puede obtenerse con un diámetro de poro entre 7 *nm* y 100 *nm*. Estos poros le confieren a la sílice una superficie específica entre 450 m^2/g y 50 m^2/g respectivamente.

La sílice tiene una resistencia mecánica elevada y resiste durante largo tiempo las presiones usuales en HPLC. Sin embargo, tiene tendencia a solubilizarse a pH por encima de 8. Aun a este pH el relleno puede colapsar, con pérdida de eficiencia de la columna y asimetría en los picos.

La sílice es ligeramente ácida, por lo que es buena para la separación de compuestos ácidos y neutros, pero no es adecuada para compuestos básicos o con polaridad elevada.

La presencia de trazas metálicas en la sílice causa asimetría en algunos picos, especialmente en muestras básicas y/o polares.

Óxido de Aluminio (Alúmina). Este soporte se usa poco actualmente. Se comercializa en un número reducido de diámetro de poros. Sus partículas son fuertes además de que resisten fases móviles con pH hasta 12. Esto permite su uso en separaciones de compuestos básicos.

Carbón Grafitado. Se oferta como esferas porosas, de varios tamaños y diámetros de poro. Son usables a cualquier pH y temperatura, pero en líneas generales tienen menor eficiencia que la sílice o la alúmina. Sus partículas son frágiles.

Requiere para su uso fases móviles muy puras, pues este relleno retiene impurezas que eventualmente pueden dar cromatogramas con un ruido inaceptable.

Además de lo expuesto, estas columnas son muy caras.

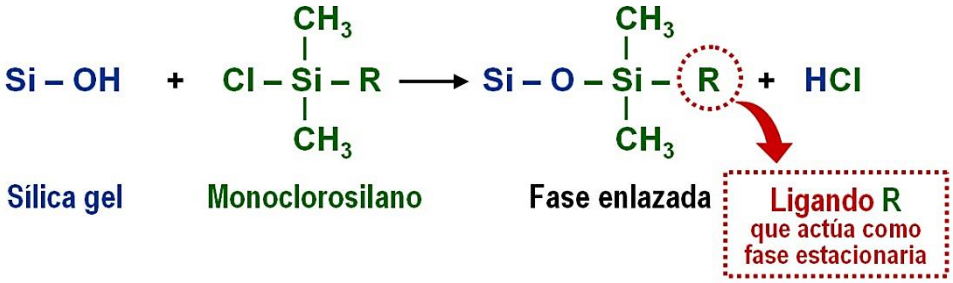
B. Sílice modificada

La mayoría de los rellenos usados hoy en HPLC tienen como base la sílice porosa, con sus grupos silanoles unidos químicamente a compuestos que le dan las características deseadas.

Los compuestos utilizados para obtener las fases enlazadas a base de sílice son los monoclorosilanos y triclorosilanos. En menor grado se usa los diclorosilanos.

Estos tienen un ligando R que le confiere finalmente a la fase las propiedades requeridas.

La expresión general de la reacción con un monoclorosilano sería:



En función de la naturaleza del grupo R se han podido obtener varios tipos de relleno de gel de sílice modificada.

- Si R es una cadena carbonada alifática no ramificada, normal de 2 átomos, 8 átomos o 18 átomos de carbono, se obtiene las fases no polares denominadas RP-2, RP-8 y RP-18 respectivamente. Estas fases, monoméricas y/o diméricas son las de mayor uso en la actualidad, tanto en HPLC analítica como preparativa.
- Cuando el ligando R es una cadena carbonada alifática corta, terminada en el grupo NH_2 o el grupo CN, se obtiene soportes polares, usables en cromatografía de fase normal, los cuales aventajan a los rellenos inorgánicos a base de gel de sílice o alúmina.
- Las fases que se obtienen cuando el ligando R termina en el grupo sulfónico ($-SO_3-H$) o el amonio cuaternario ($-NH_4^+$) tienen mucha aplicación en HPLC de intercambio iónico.
- Si el ligando termina en un diol vecino, resulta una fase estacionaria con aplicación en la cromatografía de exclusión por tamaño (SEC).

Todas las fases orgánicas con soporte de gel de sílice son muy buenas, pues no se altera su volumen por cambios de solventes de la fase móvil. Esto permite usarlas con condiciones cromatográficas muy variadas, incluyendo trabajos con programación de gradiente.

C. Fases estacionarias en base a polímeros porosos

La mayoría de este tipo de fase estacionaria tiene como base al estireno, reticulado con divinilbenceno para lograr una dureza que le permita soportar las presiones usuales en HPLC.

Se obtiene esferas del tamaño requerido para su uso en HPLC. El material es poroso, con un rango amplio de diámetros de poro, lo que permite su uso en el análisis de moléculas de peso molecular muy amplio.

Este relleno puede usarse en un rango muy grande de pH, pero a diferencia de los rellenos a base de gel de sílice, sufre modificación de su volumen (se hincha) con algunos solventes de uso común en HPLC. Esto limita su utilización en la mayoría de los casos a la cromatografía isocrática.

Este polímero es hidrofóbico por lo que sin la introducción de grupos R, puede usarse en cromatografía de fase reversa, aunque con menos eficiencia que sus análogos a base de gel de sílice.

Se han empleado también con ligandos que le confieren propiedades de exclusión y de intercambio iónico.

10.3.5.3. Los mecanismos de separación en HPLC

En HPLC se pueden realizar separaciones analíticas mediante cualquiera de los cuatro mecanismos de separación (adsorción, reparto, intercambio iónico y filtración sobre gel). A continuación, se expondrán los más utilizados.

A. Cromatografía de fase normal

Este tipo de cromatografía fue la que primero se desarrolló y está caracterizada porque la fase estacionaria es polar mientras que la fase móvil es un solvente orgánico o una mezcla de solventes orgánicos de polaridad baja, no miscibles en agua.

La fase estacionaria usada originalmente en este tipo de cromatografía fue el gel de sílice micro poroso. En la actualidad hay varias fases derivadas del gel de sílice con propiedades diferentes, de modo que se amplía el rango de utilización de la cromatografía de fase normal. En orden aproximado de utilización, las principales fases son:

ciano > gel de sílice > diol > amino

A su vez, la fuerza de la interacción de la fase estacionaria con una muestra en igualdad de fase móvil y otros parámetros es:

gel de sílice (fuerte) >> amino > diol > ciano

Esta fuerza de interacción con los analitos es de carácter adsortiva. Por lo general, la fase móvil recubre el adsorbente con una monocapa. Un analito interactúa con la fase estacionaria, por desplazamiento de una o varias moléculas de fase móvil.

En el caso de gel de sílice, como ya se ha explicado, la interacción se produce con los grupos silanoles. Esta adsorción es muy fuerte por lo que algunos picos cuando se trabaja con gel de sílice, presentan colas. Esta desventaja puede eliminarse con la adición de pequeños volúmenes de agua o etanol a la fase móvil. Con estos compuestos, llamados moduladores, se logra saturar los centros más activos del gel de sílice y los cromatogramas tienen más calidad. El efecto de los moduladores es mayor en aquellas fases móviles en la que son muy poco solubles. En el caso de la adición de alcohol a la fase móvil, la concentración máxima debe estar entre 0,01 % y 0,5 %.

Concentraciones pequeñas de agua en la fase móvil, entre 1 *mg/L* y 2 *mg/L* originan efectos grandes sobre la fuerza elutrópica de estas. La poca reproducibilidad y repetibilidad de los tr con las columnas de gel de sílice se debe casi siempre a la incorporación de vapor de agua del ambiente.

Además, la regeneración de la columna después de un análisis, conlleva el paso de volúmenes grandes de fase móvil. Cuando se trabaja con sílice modificada los inconvenientes no se presentan. Los picos no tienen colas y por lo general no se requiere una regeneración exhaustiva de la columna como en el caso del gel de sílice.

La fase móvil en la cromatografía de fase normal está constituida por lo general por dos solventes: un solvente débil, no-polar, llamado A y otro fuerte, polar, llamado B.

Para obtener una fase móvil adecuada se mezcla B con A hasta obtener una polaridad tal que origine valores de K para los componentes de la muestra en el rango $0,5 > K > 20$.

Otro aspecto a tener en cuenta en la selección de los componentes y proporción de estos en la fase móvil es la selectividad. Si α para dos componentes de la muestra está próximo a la unidad, es preciso variar el porcentaje de B, o cambiar B por otro solvente fuerte para alcanzar el objetivo, esto es obtener un valor de $\alpha \neq 1$

La retención de los compuestos en este tipo de cromatografía está relacionada con la polaridad y solubilidad de estos en la fase móvil. Así los compuestos menos polares (hidrofóbicos) eluyen primero, mientras que los más polares (hidrofílicos) son los últimos en eluir.

De forma muy general, el orden de elución en cromatografía de fase normal para compuestos R-X en donde X es un grupo funcional y R una cadena carbonada alifática, depende fundamentalmente de X y se comporta del modo siguiente:

Alquilo < halógeno (F < Cl < Br < I) < éteres < compuestos nitro < nitrilos < aminas terciarias < ésteres < cetonas < aldehídos < alcoholes < fenoles < aminas primarias < amidas < ácidos carboxílicos < ácido sulfónico.

La elección de la fase estacionaria en la cromatografía de fase normal depende como es natural del problema analítico a resolver.

El gel de sílice es excelente para separaciones complejas. Con esta fase estacionaria se logra valores adecuados de α variando casi siempre el porcentaje de B o la naturaleza de este. Para compuestos básicos, aminas, éteres, cetonas y esteres se requiere la fase amino, mientras que los compuestos muy polares deben cromatografiarse con la fase ciano.

Finalmente, considerando las propiedades generales de las sílices modificadas y del gel de sílice, se puede resumir que las primeras no requieren un control riguroso de la humedad en la fase móvil, se equilibran fácilmente, son estables y

pueden usarse en técnicas de gradiente de elución. El gel de sílice por su parte es más duradero, más selectivo (es usado en separaciones de isómeros) pero no es usable en cromatografía con gradiente de elución.

B. Cromatografía de fase reversa

Este es sin duda el tipo de cromatografía líquida más usado y el que más campos ha abarcado hasta el presente. Con fase reversa es posible analizar muestras muy variadas, desde compuestos no polares hasta polares y aún iónicos, desde moléculas pequeñas hasta polímeros de pesos moleculares altos (proteínas, DNA, plásticos). Es además el procedimiento más robusto de los usados en HPLC.

En la cromatografía de fase reversa, la fase estacionaria es siempre menos polar que la fase móvil. Esta última es casi siempre agua con un solvente orgánico polar, hidrofílico (llamado modificador orgánico), mientras que la fase estacionaria es preferentemente sílice modificada con radicales alquilo recubriendo su superficie.

El mecanismo de separación en la cromatografía de fase reversa es similar al de una partición continua entre la fase móvil polar, acuosa, que se mueve a través de un lecho hidrofóbico, apolar.

Los analitos se distribuyen acorde a su afinidad por ambas fases. Los compuestos hidrofílicos se retendrán poco y tendrán tr pequeños mientras que los hidrofóbicos interactuarán más con la fase estacionaria y tendrán tr mayores.

La fase móvil es esencialmente agua (A) con una cantidad de un solvente orgánico (B) hidrosoluble.

El porcentaje de B en la composición de la fase móvil debe ser tal que para los componentes de la muestra que se analiza, los valores de K han de encontrarse en el rango $0,5 < K < 20$. Aunque cuando se trabaja isocráticamente (con composición constante de la fase móvil) se prefiere el rango $1 < K < 10$. (7)

En RP son pocos los solventes que pueden ser usados como modificador orgánico (B), puesto que además de ser algo solubles en agua, deben tener una transparencia adecuada en el rango UV. En la práctica solo el acetonitrilo y el metanol han encontrado un uso generalizado en RP, pues son transparentes a longitudes de onda bajas (185 *nm* – 210 *nm*), aunque el tetrahidro furano, el etanol y el propanol han tenido eventualmente algún uso.

En igualdad del porcentaje del modificador, la fortaleza de la fase móvil está dada por la secuencia:

agua < metanol < acetonitrilo < etanol < tetrahidro furano < propanol

En esta serie el agua es el solvente más débil y los tr resultantes son los mayores, mientras que el propanol es el solvente más fuerte y con el los tr obtenibles son los menores.

Para cualquiera de los modificadores (B) los tr decrecen en la medida que la proporción de este crece en la composición de la fase móvil.

En la práctica se puede trabajar en un rango amplio de la composición de la fase móvil (respecto al componente B). Sin embargo esto no quiere decir que la composición elegida sea la óptima.

La composición de la fase móvil próxima a la óptima se obtiene con relativa facilidad para un analito dado, llevando a cabo una corrida con gradiente lineal de B (ver epígrafe 4). La composición de la fase móvil a la cual eluye un analito bajo esas condiciones, está muy próxima a la óptima para trabajar bajo condiciones isocráticas.

Un caso particular en la cromatografía de fase reversa está relacionado con las muestras muy hidrofóbicas (compuestos que no eluyen aún con 100 % de Acetonitrilo como fase móvil). En estos casos se elige como solvente A al Acetonitrilo mientras que el B puede ser el tetrahidro furano, el diclorometano o la acetona.

Cromatografía de fase reversa – par iónico

La cromatografía de par iónico es un método ingenioso de analizar iones por un procedimiento totalmente diferente al del intercambio iónico. En esencia consiste en añadir un contraión (Ci) a la fase móvil, el cual se une químicamente al ión del analito (I) originando un compuesto neutro que se analiza en fase reversa. El contraión es un compuesto que es capaz de reaccionar rápida y reversiblemente con el ión (el analito) en la muestra y tiene además un grupo hidrofóbico que interactúa con la fase estacionaria.

Hay dos teorías para explicar la forma en que se produce la separación en la cromatografía de par iónico. En una de ellas el contraión y el ión se unen en la fase móvil y el producto (ICi) interactúa con la fase estacionaria (fase reversa) acorde a la ecuación.

$$I^{+-}_{\text{acuoso}} + Ci^{+-}_{\text{acuoso}} \leftrightarrow ICi_{\text{acuoso}} \leftrightarrow ICi_{\text{en la fase estacionaria}}$$

La segunda teoría supone que el contraión interactúa con la fase estacionaria (se retiene en ella, y después, desde esta, forma el compuesto con el ión (analito).

$$I^{+-}_{\text{acuoso}} + Ci^{+-}_{\text{en la fase estacionaria}} \leftrightarrow ICi_{\text{en la fase estacionaria}}$$

En la práctica, los dos mecanismos se complementan y ambos explican, desde posiciones extremas, lo que ocurre durante la separación.

La figura 10.5 ilustra esquemáticamente estos mecanismos

Las columnas usadas en la cromatografía de par iónico son las RP monoméricas, pues con ellas se obtiene los mejores resultados. La fase móvil es casi siempre agua: metanol. La proporción la determina el analista acorde al problema concreto a resolver. El rango de pH es por lo general de 2 – 8, aunque siempre hay que tener presente la característica del contraión que se vaya a usar.

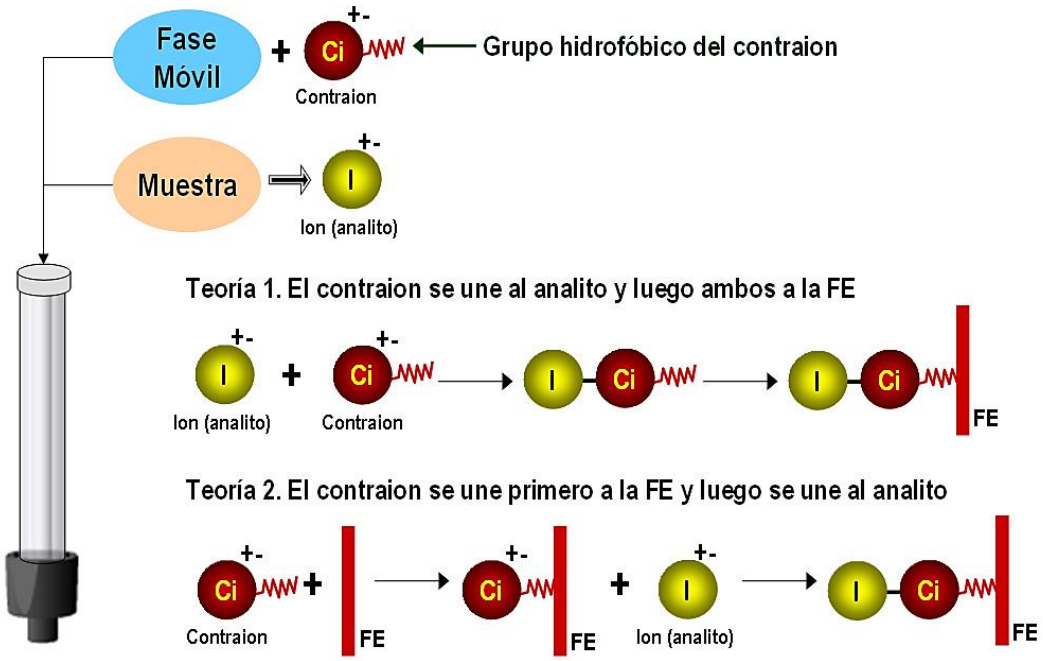


Figura 10.5. Mecanismo de fase reversa – par iónico

Las columnas usadas en la cromatografía de par iónico son las RP monoméricas, pues con ellas se obtiene los mejores resultados. La fase móvil es casi siempre agua: metanol. La proporción la determina el analista acorde al problema concreto a resolver. El rango de pH es por lo general de 2 – 8, aunque siempre hay que tener presente la característica del contraión que se vaya a usar.

Los contraiones usados frecuentemente para muestras catiónicas son:

- Aniones inorgánicos (acetato, Cl^-, I^-, Br^-, PO_4^{3-})
- Alquilsulfonato con R de C_1 a C_{16}
- Toluensulfonato
- Naftalensulfonato
- Alquilsulfato con R de C_1 a C_{12}
- Citrato
- Tartrato

Para los compuestos aniónicos, se usa como contraión:

- Tetraalquil amonio (R_4N^+), con R de C_1 a C_7
- Trialquil amonio (R_3NH^+) con R de C_1 a C_8

Puede usarse los cationes Na^+, K^+, Cs^+, Mg^{+2} y Ca^{+2}.

El tiempo de retención en par iónico depende del tipo de contraión. El tr será mayor cuanto mayor sea la tendencia del contraion a formar par iónico, así como cuanto mayor sea el peso molecular del contraion y mientras más grande sea el carácter lipofílico del contraion.

La concentración del contraión por lo general es baja. El rango óptimo se encuentra entre 0,002 molar y 0,05 molar. La concentración del contraión también influye sobre el tr (crece con ésta).

C. Cromatografía de intercambio iónico

La cromatografía de intercambio iónico y la cromatografía de fase reversa – par iónico, tienen muchos aspectos en común. En especial el mecanismo de separación es muy similar. Pero debido a las características favorables de la cromatografía de fase reversa, muchos de los compuestos que en la década de los años 70 (poco después de la comercialización de los primeros equipos para HPLC en 1968) se cromatografiaban mediante intercambio iónico, hoy se analizan por par iónico. En especial los iones pequeños, pues con par iónico es mejor la resolución y los resultados son más reproducibles.

El principio y el campo de aplicación de la cromatografía de intercambio iónico ya fueron expuestos en un capítulo precedente. Sin embargo, las características de la HPLC imponen exigencias al intercambiador iónico que sirve de relleno a la columna. Este material ha de resistir las presiones elevadas con que se trabaja en este tipo de cromatografía. Por su naturaleza han sido dos los rellenos usados hasta el presente:

a) Gel de sílice modificada químicamente con grupos de amonio cuaternario o de ácido sulfónico (intercambiadores aniónicos o catiónicos, respectivamente).

b) Resinas poliméricas altamente reticuladas que poseen los grupos funcionales antes mencionados. La estabilidad ácido – base de estas resinas es superior a la de la sílice modificada.

La fase móvil es por lo general un buffer acuoso diluido, aunque es posible utilizar sistemas de solventes hidroorgánicos.

El incremento en la concentración del buffer resulta en una reducción de los tr de los componentes de una muestra. A su vez, la naturaleza de los aniones o cationes constituyentes del buffer o de la sal que se adiciona a la fase móvil, influyen selectivamente sobre los tr. En general, la carga elevada tanto del anión como del catión conduce a un aumento del tiempo de retención.

Para el intercambio aniónico, la fuerza desplazante está indicada para un grupo de aniones de uso común:

F^- (débil) < OH^- < acetato < CI^- < SCN^- < Br^- < CrO_4^- < NO_3^- < I^- < oxalato^{2-} < citrato^{3-} (fuerte)

La fuerza desplazante en intercambio catiónico está dada en la serie:

Li^+(débil) < H^+ < Na^+ < NH_4^+ < K^+ < Rb^+ < Cs^+ < Ag^+ < Mg^{2+} < Zn^{2+} < Cu^{2+} < Ni^{2+} < Ca^{2+} < Pb^{2+} < Ba^{2+} (fuerte)

Para cambiar la selectividad en una separación por intercambio iónico, es preciso cambiar la naturaleza de la sal.

Para la detección de iones por cromatografía líquida hay varios detectores, como el de conductividad, el refractométrico, el espectrofotométrico (en el rango UV de 200 *nm* a 400 *nm*) y especialmente el electroquímico.

D. Cromatografía de filtración sobre gel

En HPLC pueden también emplearse columnas de filtración sobre gel (GPC, del inglés *Gel Permeation Chromatography*) o exclusión molecular para realizar separaciones de mezclas de compuestos en función de la masa molecular. Esta cromatografía es aplicable a compuestos con masas moleculares superiores a 2000 y el mecanismo de separación, así como sus características generales ya fueron explicadas en el epígrafe 7.3.4 del capítulo 4 de este texto.

Los rellenos de las columnas de GPC para HPLC pueden ser de dos tipos:

- Gel de sílice o polímeros orgánicos semirrígidos, que se ofertan con distintos diámetros de poro que van desde 4 *nm* (para separar masas moleculares de 50 a 4000) hasta 400 *nm* con el que se puede obtener separaciones de muestra con masas moleculares en el rango de 10^4 Dalton a 10^7 Dalton.
- Polímeros orgánicos, los que tienen un rango amplio de diámetros de poros y permite separar muestras con masas moleculares desde 200 Dalton hasta 10^7 Dalton o aún mayores.

Cuando se trabaja con este último tipo de relleno, la presión no debe exceder de los 100 bar para evitar daños en la estructura de este.

La fase móvil debe tener una viscosidad baja, preferentemente inferior a 0,7 cP. Entre los solventes más utilizados en GPC se encuentran el tetrahidrofurano, diclorometano, cloroformo, tolueno y dimetilformamida.

Es importante tener en cuenta las indicaciones del fabricante pues hay incompatibilidades de algunos rellenos con determinados solventes.

La exclusión en fase acuosa utiliza como fase estacionaria partículas esféricas de gel de sílice modificada con diversos tamaños de poros que permiten separaciones de muestra con masas moleculares desde 200 Dalton hasta más de 10^7 Dalton. La fase móvil es agua o un buffer acuoso.

Las tablas 10.2 y 10.3 muestran algunas fases estacionarias de amplio uso en la actualidad, así como los criterios de selección del tipo de cromatografía en función de las características de los componentes a separar.

Tabla 10.2.

Fases estacionarias empleadas en HPLC

FASE ESTACIONARIA.	FASE MOVIL.	APLICACIONES.
Gel de sílice. **Si-OH**	Hexano, $CHCl_3$ e isopropanol.	**Adsorción** Ésteres, éteres, porfirinas micotoxinas y vitaminas liposolubles.
Alúmina. **Al_2O_3**	Hexano, $CHCl_3$ e isopropanol.	**Adsorción** Aminas.
Amino. **Si-$(CH_2)_3$-NH_2**	Hexano, $CHCl_3$ e isopropanol.	**Fase Normal** Azúcares, esteroides y nitroderivados.
Ciano. **Si-$(CH_2)_3$-CN**	Hexano, $CHCl_3$ e isopropanol.	**Fase Normal** Aminoácidos y nitroderivados.
Diol. **Si-$(CH_2)_3$-O-CH_2-[CH(OH)]$_2$**	Na_2HPO_4 0.1 M y agua.	**Fase Normal** Proteínas, péptidos y tensoactivos acuosos.
Octadecilsilano (C-18) **Si-$(CH_2)_{17}$-CH_3**	Agua, metanol, THF y acetonitrilo.	**Fase Reversa** Analgésicos, aromáticos, polinucleares y ftalatos.
Octilsilano (C-8) **Si-$(CH_2)_7$-CH_3**	Agua, metanol, THF y acetonitrilo.	**Fase Reversa** Catecolaminas, esteroides aceites esenciales.
Dimetilsilano (C-2) **Si-$(CH_3)_2$**	Agua, metanol y acetonitrilo.	**Fase Reversa** Aminas, fenoles y vitaminas hidrosolubles.
Divinilbenceno sulfonado.	Agua.	**GPC** Proteínas, péptidos y azúcares.
Divinilbenceno.	$CHCl_3$, THF.	**GPC** Polímeros y gomas.
Vidrio poroso.	THF, alcoholes, agua.	**GPC** Compuestos biológicos.
Sephadex	Agua, buffer	**GPC** Compuestos biológicos, proteínas, carbohidratos.
Resina fuertemente ácida **$-SO_3^-$**	Na_2HPO_4 0.01-0.1 M	**Intercambio iónico** Vitaminas hidrosolubles, purinas, aminoácidos y nucleósidos.
Resina fuertemente básica **$-NH_4^+$**	Na_2HPO_4 0.01-0.1 M	**Intercambio iónico** Nucleótidos.

Tabla 10.3.

Criterios de selección del tipo de cromatografía según las características de los compuestos a separar con masas moleculares menores de 2000.

Solubilidad	Carácter polar y/o iónico	Tipo de cromatografía	Fase estacionaria	Fase móvil
Solventes orgánicos	No polar, no iónico	RP	RP-2 a RP-18	CH_3-CN: H_2O; MetOH: H_2O
		Adsorción	Gel de Sílice (Si-40 a Si-100)	cloroformo, diclorometano
		Partición	Gel de Sílice modificada (Si-NH_2, Si-CN, Si-diol)	diclorometano, metanol
	Polar, ionizable	RP con control de pH	RP-2 a RP-18	CH_3-CN:buffer acuoso MetOH: buffer acuoso
		RP- par iónico	RP-2 a RP-18	CH_3-CN: buffer acuoso + contraión
		Partición	Gel de Sílice modificada (Si-NH_2, Si-CN, Si-diol)	THF, MetOH H_2O, solución buffer
Agua	Polar, no iónico	RP	RP-2 a RP-18	CH_3-CN: H_2O, MetOH:H_2O
		Partición	Gel de Sílice modificada (Si-NH_2, Si-CN, Si-diol)	MetOH, CH_3-CN, H_2O
	Iónico	RP– par iónico	RP-2 a RP-18	CH_3-CN: buffer acuoso + contraión
		Intercambio iónico	Intercambiador aniónico o catiónico	buffer acuoso

10.3.5.4. Especificaciones de las columnas cromatográficas

Teniendo en cuenta la diversidad de proveedores de columnas cromatográficas, con frecuencia no basta con seleccionar un relleno, un tamaño de partículas y unas dimensiones concretas. Para estos mismos parámetros, los resultados cromatográficos de dos columnas pueden ser muy diferentes, si estas son de distintos fabricantes.

Por esta razón, en ocasiones se requiere información adicional concerniente a especificaciones y eficiencia de la columna que se pretende adquirir, especialmente si por razones de aseguramiento de la calidad es preciso repetir condiciones analíticas.

Los parámetros más estrechamente vinculados con la eficiencia de la columna cromatográfica y que por lo general se requiere conocer antes de usarla de forma rutinaria son:

- Números de platos teóricos para un analito dado y un valor concreto de K.

- Factor de asimetría de un pico.
- Selectividad determinada para dos compuestos similares.
- Reproducibilidad del tiempo de retención.
- Caída de presión para una fase móvil y temperatura requerida.
- Estabilidad de la columna.

En caso de columnas de sílice modificada, con frecuencia es preciso conocer además de lo expuesto: la concentración de la fase enlazada (porcentaje de carbono orgánico, por ejemplo), así como si la fase es monomérica o polimérica.

Algunos de los parámetros indicados pueden obtenerse del fabricante. Hay columnas que se suministran con cromatogramas tipos. Otros parámetros se precisa determinarlos en el laboratorio y sirven al analista para la toma de decisiones en adquisiciones futuras.

10.3.5.5. Problemas de la columna cromatográfica

Durante el uso de la columna cromatográfica surgen problemas, algunos normales, debidos al número de muestras inyectadas y a las condiciones de operación. Otros dependen del cuidado al que son sometidas por el analista.

Los problemas se pueden agrupar en tres tipos: variabilidad en tiempos de retención y resolución, formación de colas y vida útil muy corta

- **Variabilidad en los tiempos de retención y en la resolución**

  Debido al uso prolongado de la columna comienza a producirse variaciones en los t_r y en la selectividad (α). Estas variaciones son aceptables si no exceden 3 % respecto al valor óptimo de la columna.

  Las causas de este comportamiento son varias: pérdida de fase estacionaria; disolución parcial de la sílice (aun en el caso de rellenos de fase enlazada) y acumulación de impurezas que no eluyen con las condiciones normales de trabajo.

  Otros factores que influyen y que no dependen directamente de la columna son: cambios en la composición de la fase móvil; cambios de flujo; variaciones de temperatura; falta de equilibrio entre análisis sucesivos y la inyección de tamaños de muestra excesivos.

- **Formación de colas**

  La formación de colas debe evitarse o reducirse al mínimo por el efecto adverso que tiene sobre la resolución y la exactitud de las determinaciones. Una cola puede invadir la zona de elución de un componente próximo, con lo que se reduce la exactitud de la determinación cuantitativa de ambos.

  El cálculo del número de platos teóricos y la resolución pueden sobreestimarse cuando los picos involucrados tienen cola.

Las causas para la formación de cola son varias. Algunas dependen de la columna, del uso al cual está destinada y otras de las condiciones de operación.

Las causas principales son: columna de calidad baja (no llenada adecuadamente); fritas obstruidas; acumulación de impurezas fundamentalmente a la entrada de la columna; sobresaturación (muestras muy grandes); efectos extracolumna; retención secundaria (debida a silanoles libres en el caso de rellenos de fase enlazada); buffer no apropiado o falta de buffer.

- **Vida útil muy corta**

  El trabajo estable y la vida útil de una columna cromatográfica de calidad buena dependen en gran medida de la aplicación que se le dé y del trato que reciba. Aun con condiciones inobjetables (muestras limpias, no agresivas) y buen manejo, las columnas tienen una vida limitada. Pero esta vida útil varia de laboratorio a laboratorio y dentro de un mismo laboratorio acorde al trabajo específico al cual se dedica la columna.

  Como orientación, una columna debe desecharse cuando el valor de n inicial se haya reducido a la mitad, mientras que el valor de α descendió a 75 % de su valor óptimo. Otro elemento para desechar la columna es el incremento en el factor de asimetría. Si este es ≈ 2 la columna debe desecharse. Sin embargo, columnas con estas características pueden ser usadas en trabajos menos exigentes.

  La vida útil debe expresarse por el número de muestras analizadas. Una columna normal permite el análisis de 1000 – 1500 muestras limpias, no agresivas, mientras que este número se reduce a 50 – 250 en el caso de muestras complejas (extractos de tejidos y fluidos biológicos, muestras vegetales, suelos y sedimentos con un contenido alto de materia orgánica) sometidas a purificaciones simples.

  Si se tiene el registro del trabajo que se realiza con una columna, esta debe cambiarse cuando se haya analizado el número de muestras indicado en cada caso.

  Por el costo de las columnas cromatográficas hay laboratorios que prolongan la vida útil de estas, tal como se indicó en párrafos anteriores.

  En igualdad de condiciones las columnas que más duran son las usadas en HPLC – fase normal. En ese orden le siguen las columnas poliméricas, mientras que las columnas usadas en fase reversa, y sobre todo cuando se utiliza en la modalidad RP – par iónico, son las que tienen una vida más corta. Esto se debe a que las fases acuosas son más agresivas que los solventes orgánicos usados en la modalidad de fase normal.

10.3.6. Los detectores

Han sido desarrollados numerosos detectores para ser usados en los sistemas de cromatografía líquida. Además, se ha intentado adaptar a esta técnica algunos detectores de gran uso en cromatografía gaseosa, pero esto no es aún una realidad en muchos casos. Lo cierto es que en el momento en que nos encontramos, el número de detectores adquiribles en HPLC es relativamente reducido. En los párrafos siguientes se describirá brevemente las características y la aplicación de la mayoría de los detectores actualmente en uso en esta rama analítica.

Se describirá además algunos detectores que, aunque aún no se comercializan ampliamente, son ejemplos notables del desarrollo alcanzado por la HPLC en este aspecto.

10.3.6.1. Detectores espectrofotométricos UV-Vis

Este tipo de detector se puede usar en el rango ultravioleta (desde 190 *nm* hasta 360 *nm*), en el visible (más de 360 *nm* hasta 800 *nm*) o en ambos, dependiendo del fabricante. Hay tres tipos fundamentales de detectores: el detector de longitud de onda fija, el de longitud de onda variable y el detector de arreglo de diodos, también llamado multiespectral. En todos ellos una fuente luminosa procedente de una lámpara apropiada pasa a través de una celda de flujo que está conectada a la salida de la columna, y llega a un fototubo o a un diodo donde se mide la intensidad de luz I (figura 10.6). Usualmente la luz de la lámpara se dirige hacia el fototubo (o diodo) de referencia donde se mide la intensidad original de luz I_0 .Mediante un dispositivo electrónico el detector transforma estas dos señales en absorbancia (A)

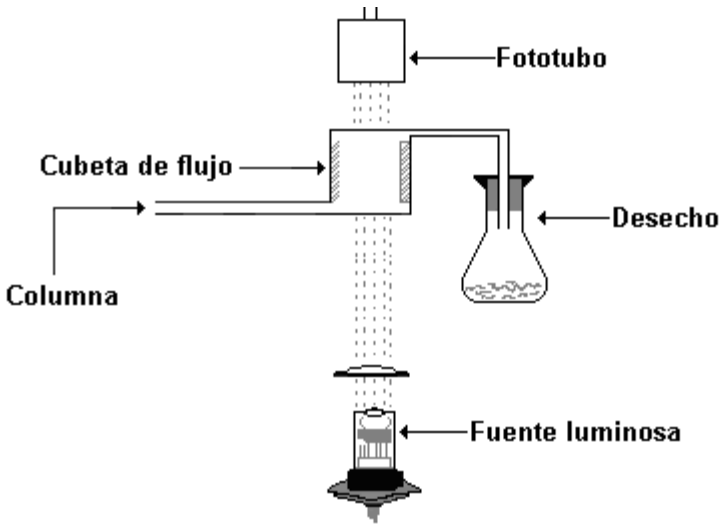


Figura 10.6. Esquema de un detector UV para HPLC

El detector de longitud de onda fija, utiliza una fuente luminosa que emite una radiación I_0 muy fuerte. Por tal razón la sensibilidad de este detector es muy buena. Sin embargo, no tienen mucha aplicabilidad.

El detector de longitud de onda variable es algo menos sensible, pero es aplicable a un número mayor de muestras diferentes.

La sensibilidad en líneas generales se encuentra en el rango de los *ng* a los μg, pero depende fuertemente de la naturaleza del analito.

El volumen de la celda de medición de ambos detectores es inferior a 10 microlitros y el paso óptico es del orden de 10 *mm*. Son detectores estables, con un nivel de ruido muy bajo.

Estos detectores son los más usados en HPLC y solo requiere que el solvente sea transparente a la longitud de onda de trabajo en UV. Su utilización depende de la naturaleza del analito (que absorba en UV o que tenga color)

La aplicación de la microelectrónica y la computación en la fabricación de instrumentos científicos, unido al desarrollo de software especializados, ha permitido el surgimiento y utilización a gran escala, de uno de los detectores más importantes y sensibles de los que se ofertan hoy para HPLC: el detector multiespectral o de arreglo de diodos.

Los primeros detectores de arreglo de diodos trabajaban en el rango de 190 *nm* hasta 400 *nm*, mientras que los que se ofertan hoy abarcan también el rango visible.

El sistema electrónico de estos detectores permite de forma continua y mientras dura el análisis, captar varios espectros de absorción en una fracción de segundo (en el rango de longitud de onda de interés). Esta información se guarda en la memoria de la PC y al final de la corrida se integra para dar un cromatograma tridimensional absorción – longitud de onda – tiempo de retención.

Las posibilidades que brinda el detector de arreglo de diodos y su software específico son muchas. Entre ellas, poder determinar y mantener en la memoria del equipo el cromatograma tridimensional del blanco de reactivos (eventualmente el blanco de la matriz que acompaña a un compuesto de interés). Estos cromatogramas se pueden sustraer del obtenido de la muestra, resultando solamente uno más limpio, más fácil de interpretar, el cual sirve para identificar trazas o componentes minoritarios de la muestra con mucha sensibilidad y un grado elevado de exactitud.

Pero además permite hacer comparaciones y búsqueda de cromatogramas similares almacenados en un archivo (con fines de identificación), entre otras opciones de interés analítico y del aseguramiento de la calidad correspondiente.

10.3.6.2. Detector refractométrico

Es un detector de uso general, utilizado en la determinación de aquellos compuestos para los que sea posible usar una fase móvil que como característica sobresaliente, tenga un índice de refracción diferente al de estos. Es el detector de menos sensibilidad de los usados en HPLC. Por lo general no detecta por debajo del microgramo de compuesto. Se opera de forma diferencial, usando dos

celdas, una de medición y otra de referencia, por la que pasa exclusivamente la fase móvil. Tiene uso en la determinación de azúcares y oligómeros sintéticos. No puede usarse cuando se trabaja con gradiente. Es además muy sensible a los cambios de temperatura por lo que requiere una climatización estable del local de trabajo.

10.3.6.3. Detector de fluorescencia

Este detector es uno de los más sensibles actualmente en uso. Es ideal para la determinación de trazas, especialmente en matrices complejas, basado fundamentalmente en su selectividad elevada. Es tres órdenes de magnitud más sensible que el detector UV o el de ordenamiento de diodos. Tiene también un rango lineal amplio (10^3 - 10^4).

El detector es selectivo ya que no todos los solutos son capaces de fluorescer, además los que se excitan, lo hacen generalmente a longitudes de onda incidentes diferentes. Esto quiere decir que, si se selecciona adecuadamente la longitud de onda, se puede lograr la respuesta de un analito en presencia de otros compuestos, sin que se produzcan interferencias.

Este detector como se señaló, es muy sensible. Responde satisfactoriamente en trabajos de rutina ante cantidades del orden de los picogramos en el volumen de la muestra inyectado.

Es importante señalar que la señal fluorescente y la longitud de onda óptima de la radiación excitadora dependen de la temperatura, la polaridad y la viscosidad de la fase móvil y del pH. Está en manos del analista lograr un compromiso satisfactorio entre una buena separación cromatográfica y una buena detección.

La gran sensibilidad de la detección fluorométrica ha hecho posible que se extienda el campo de aplicación del detector de fluorescencia aún a compuestos que no son fluorescentes. En estos casos se requiere del acoplamiento químico de la muestra con un compuesto fluoróforo. Esta reacción química puede llevarse a cabo pre o post columna. Algunos de estos fluoróforos se usan extensamente y son clásicos en la literatura científica. Entre ellos por solo citar unos ejemplos se encuentran el 4 bromometil, 7 etoxicoumarina (BrMMC) usado en el análisis de ácidos grasos; la dansilhidrazina (DNS–hidrazina), utilizada fundamentalmente en la determinación de aldehídos, cetonas y azúcares; el cloruro de dansilo (DNS-CL), para aminas y aminoácidos y la 4 cloro 7 nitrobenzofurazano (NBD–CL) que tiene campos de aplicación en aminas primarias y secundarias. El más conocido de estos agentes fluoróforos es sin duda el OPA (anhídrido orto ftálico). Este compuesto se usa ampliamente en el análisis de aminoácidos, péptidos y aminas.

10.3.6.4. Detector electroquímico

Es un detector muy sensible y selectivo. Se utiliza en la detección de solutos que puedan oxidarse o reducirse.

En esencia, el detector está constituido por una microcelda a través de la cual fluye la fase móvil. En ella hay situados dos electrodos, uno llamado de trabajo y el otro denominado electrodo auxiliar.

La respuesta del detector se origina cuando las moléculas del analito sufren una reacción redox en el electrodo de trabajo. Paralelamente ocurren reacciones electroquímicas en el electrodo auxiliar, restableciéndose el equilibrio eléctrico mediante el flujo hacia ambos electrodos de los iones presentes en la fase móvil (como componentes de esta). En ausencia de muestra, está pasando fase móvil solamente por la celda y entre ambos electrodos se mantiene una corriente iónica portada por el electrolito. La oxidación o reducción de un analito sobre el electrodo de trabajo provoca un cambio en esta corriente, que previamente amplificada y registrada en función del tiempo origina el cromatograma (el pico) del analito en cuestión.

La reacción sobre el electrodo de trabajo es muy rápida. La concentración del analito se reduce allí casi a cero, por lo que la respuesta del detector está limitada por la difusión de la muestra hacia la superficie del electrodo de trabajo.

La fase móvil es por lo general una solución acuosa diluida de un electrolito, una solución buffer diluida o un solvente hidrofílico que contiene un electrolito.

La selectividad del detector electroquímico se basa en que no todos los analitos sufren oxidación (o reducción). En el caso de los compuestos que sufren reacciones redox, la selectividad, se logra mediante el ajuste a un valor determinado del voltaje entre el electrodo de trabajo y el electrodo auxiliar. La gran sensibilidad (del orden de los picogramos) se debe al pequeño volumen de celda y a la rapidez con que ocurren las reacciones electroquímicas. Comercialmente se oferta detectores con volúmenes de dos microlitros y aun menores. Experimentalmente se ha fabricado algunos detectores electroquímicos con celdas muy pequeñas, tan solo de unos pocos nanolitros.

Las variaciones de la temperatura afectan la respuesta del detector. Aunque es posible operar un detector electroquímico a temperatura ambiente, la máxima estabilidad se alcanza cuando el equipo se encuentra en un área de temperatura constante.

La adsorción de algunos productos de las reacciones que tienen lugar sobre los electrodos, cambia la respuesta del detector. Esto requiere una calibración frecuente y una limpieza de los electrodos o cambio de estos, especialmente el de trabajo, cosa que en los equipos modernos se realiza con facilidad.

La sal requerida para mantener la conductividad de la solución limita considerablemente el número de fases móviles utilizables con este detector. En caso de que la separación cromatográfica no permita la adición de un electrolito, este puede introducirse a la salida de la columna.

La principal utilización del detector electroquímico se encuentra en los campos de la bioquímica y los fármacos. Compuestos como las catecolaminas, algunas

vitaminas, hormonas estrogénicas, analgésicos y narcóticos, se determinan con una sensibilidad buena.

10.3.6.5. Detector de conductividad

Es un detector útil en la determinación de compuestos iónicos o ionizables. El detector está constituido por dos celdas, una de medición y otra de referencia. La fase móvil es una solución acuosa muy diluida de sales, ácidos o bases. Por lo general las celdas de este detector son pequeñas (del orden de los microlitros). Los electrodos son de platino.

Hay detectores de conductividad que resisten presiones elevadas. Esto es importante ya que no es necesario trabajar con dos bombas. Basta intercalar la celda de referencia entre la bomba y el inyector (o válvula de introducción de muestras). La sensibilidad es moderada.

10.3.6.6. Otros detectores usados en HPLC

En la actualidad han comenzado a desarrollarse otros detectores para los que se prevé una aplicación extensa a corto plazo. El desarrollo de esos detectores ha estado vinculado con la introducción de las columnas de diámetro pequeño y en especial de las columnas capilares.

De forma muy breve se describen las principales características de estos detectores:

- **Detección en la Columna**

  Las ventajas de la radiación láser sobre las del arco de mercurio, ha hecho posible el desarrollo de un modo de detección fluorescente que utiliza una parte de la columna como celda de flujo.

  En efecto, con el uso del láser como fuente excitadora se obtiene una ventaja sobre la excitación clásica. La radiación láser es muy compacta, coherente, planar, con una dispersión mínima fácilmente eliminable (la luz del arco de mercurio por el contrario es omnidimensional)

  Si se elimina la poliimida en un segmento pequeño de una columna cromatográfica capilar y se enfoca la radiación láser hacia ese lugar, se logra detectar compuestos fluorescentes, en concentraciones extraordinariamente bajas, por lo menos tres órdenes de magnitud por debajo de lo obtenible con un detector convencional. El volumen iluminado es del orden de los picolitros.

  La emisión fluorescente se mide en una dirección tal que la radiación láser excitadora no influya en esa magnitud.

  La resolución cuando se usa este detector, está dada por la longitud del segmento de columna iluminado por el láser.

- **Detector de lente térmico**

  Se ha desarrollado un detector que utiliza la radiación láser y el principio de la detección en columna ya explicado, pero aplicable a compuestos que se

excitan pero que no emiten radiación fluorescente al retornar al estado base. En esencia, consiste en hacer llegar la radiación láser a un segmento corto de la columna capilar. Las moléculas del analito al pasar por esa sección de la columna se excitan. Al volver al estado base generan calor. Esta pequeña perturbación térmica local cambia el índice de refracción de esa zona en una magnitud tal que es posible detectarlo.

Este detector es de uso general y tiene una sensibilidad muy buena, en el rango de los *ng* a los *pg*.

- **Detector de dispersión de luz**

  El detector de dispersión de luz es otro que ha sido desarrollado después que se introdujeron las columnas capilares en HPLC. Este detector responde por igual ante muestras de naturaleza química muy diferente. Es pues un detector universal. Tiene como requisito que la fase móvil sea fácilmente volatilizable y ha encontrado mayor aplicación desde la introducción de las columnas de diámetro pequeño.

  El principio del detector es simple. El eluato de la columna se hace llegar a una cámara donde se nebuliza para facilitar la evaporización de la fase móvil. Las partículas del analito se conducen hacia la celda de dispersión de luz. A través de esa celda pasa continuamente un haz de luz de longitud de onda apropiada. Parte de esa luz es dispersada por las micropartículas de la muestra. La intensidad de la luz dispersada se capta y amplifica mediante un tubo fotomultiplicador.

  La magnitud de la luz dispersada es proporcional a la concentración de la muestra. El tubo fotomultiplicador debe situarse de modo tal que su respuesta no esté afectada por la luz no dispersada (procedente de la fuente).

10.3.6.7. Acople de la HPLC con espectrometría de masas.

El valor de la espectroscopia de masas (MS) como técnica eficaz en la identificación de la estructura de compuestos químicos fue reconocido hace varias décadas. El espectro de masas da una información concerniente al ordenamiento estructural de los átomos en una molécula. La interpretación de los espectros de masas brinda una información cualitativa inequívoca acerca de la identidad de un compuesto. En sus inicios, esta interpretación era difícil y requería de una cierta especialización de los analistas. No obstante, estas dificultades, el reconocimiento de su potencial identificador situaba a la MS en un lugar cimero.

Un uso amplio y creciente ha tenido el acoplamiento de la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con espectrometría de masa (MS del inglés *"mass spectrometry"*). Por la importancia de esta técnica, se describen a continuación los aspectos fundamentales.

El espectrómetro de masas

Todo espectrómetro de masas está constituido por tres elementos o partes esenciales: *la fuente de ionización, el analizador de masas y el detector*.

De modo muy general el proceso que ocurre es el siguiente:

Las moléculas eluidas de la columna son ionizadas y fragmentadas en la fuente de ionización, pues el espectrómetro de masas solo es capaz de detectar especies iónicas.

Los iones formados en la fuente (la molécula cargada o ión molecular) así como los fragmentos de esta son separados y enfocados hacia el detector mediante el analizador de masas. Los haces de iones de igual relación masa/carga (*m/z*) impactan en el detector, el cual determina su intensidad.

El analizador del MS es análogo al prisma o monocromador de un espectrofotómetro, pero en este caso, los iones son separados acorde a sus valores de *m/z*, en lugar de la separación de los fotones.

El detector del MS es también análogo al del espectrofotómetro, pero en el primer caso se utiliza un multiplicador electrónico en lugar de un fotomultiplicador como en el segundo.

Un esquema conceptual del funcionamiento de un espectrómetro de masas se muestra en la figura 10.7.

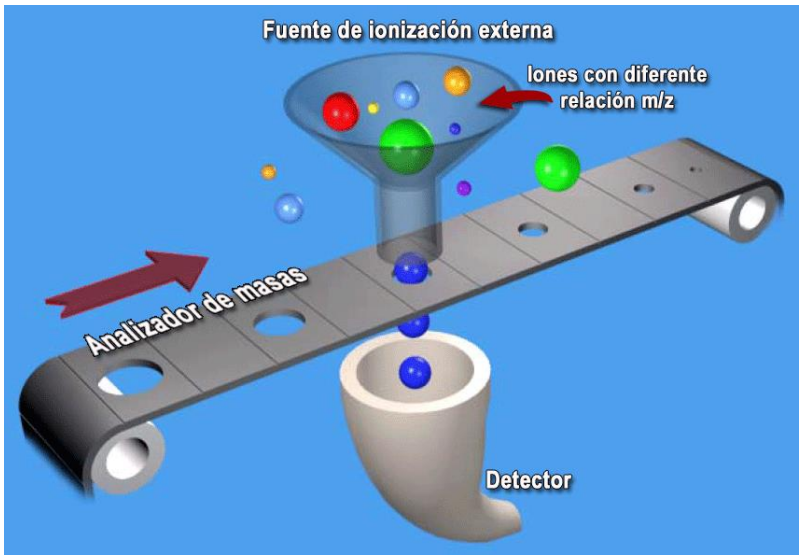


Figura 10.7. Esquema conceptual del funcionamiento de un espectrómetro de masas

La fuente iónica. Una vez que las moléculas de la muestra salen de la interfase y entran en la cámara de ionización se ionizan, eventualmente también se fragmentan, originando iones de distinta relación *m/z*. El esquema general de ionización y fragmentación es el siguiente:

IONIZACIÓN $ABCD + \text{fuente} \rightarrow ABCD^{+\cdot}$ (ión molecular)

FRAGMENTACIÓN $ABCD^{+\cdot} \rightarrow AB^{\cdot} + CD^{+}$

$ABCD^{+\cdot} \rightarrow AB^{+} + CD^{\cdot}$

$ABCD^{+\cdot} \rightarrow ACD^{+} + B.$ … etc.

Son varios los métodos usables para provocar la ionización y fragmentación de las moléculas que llegan a la cámara de ionización.

El método más simple, el que primero se usó y aún continúa vigente en muchas aplicaciones, es el del impacto electrónico (EI), también conocido por ionización electrónica. Por lo general este método además de originar el ión molecular **$ABCD^{+\cdot}$** (la molécula no fragmentada, cargada por captación o perdida de un electrón) produce una fragmentación significativa de la molécula. En general la ionización es máxima cuando el voltaje de aceleración de los electrones está en orden de los 50v-70v.

El método de EI no debe usarse para compuestos que se fragmentan muy fácilmente. En estos casos es difícil determinar las masas moleculares. Tampoco es bueno el método cuando se requiera analizar isómeros.

La ionización química (CI) por el contrario es un método de ionización menos fuerte, con el cual se favorece la formación preferencial (aunque no exclusiva) del ión molecular (**$ABCD^{+\cdot}$**). Para lograr esto se introduce constantemente en la cámara de ionización una sustancia química la cual se ioniza con facilidad mediante impacto electrónico originando un gas reactivo. Este actúa sobre las moléculas de la muestra provocando transferencias de carga, pero con poca transferencia de energía por lo que la fragmentación es poco probable aunque en algunos casos puede ocurrir.

Entre las ventajas de la ionización química sobre el impacto electrónico se señalan:

- Puede determinarse la masa molecular de la muestra.
- Es más sensible y selectivo en el caso de muestras complejas, pues puede buscarse condiciones de ionización adecuadas a un compuesto dado.
- Permite distinguir entre isómeros y estereoisómeros.
- La fragmentación es poca por lo que los espectros son más fáciles de interpretar.
- Es muy bueno cuando se usa el método de cuantificación SIM (selective ion monitoring).

Analizador de masas*.* Los iones formados en la cámara de ionización entran de inmediato en el analizador de masas. La función de esta parte del espectrógrafo de masas es filtrar o "enfocar" los iones de igual relación *m/z* hacia el detector.

Para ello y como las especies a separar son iones en movimiento, se hace uso de la interacción simultánea de campos eléctricos y magnéticos sobre los primeros,

acorde a las leyes de la electroestática y la electrodinámica. Esto da origen al analizador de masas de doble enfoque (eléctrico y magnético).

El objetivo, como se expresó es guiar todos los iones formados hacia un punto (el detector) y como estos tienen masas y/o cargas diferentes (ión molecular, fragmentos iónicos) es preciso incrementar progresivamente la intensidad del campo magnético y la corriente directa, que crea un campo electrostático también creciente.

Las posibilidades que brinda la electrónica, los materiales novedosos, la mecánica de alta precisión, así como el uso de PC y softwares especializados han permitido el desarrollo y puesta en práctica de varios tipos de analizadores de masa tales como el cuadrupolo y el Ion Trap Analyzer con características variadas de trabajo en especial el rango de relación *m/z* máximo y mínimo que abarcan, así también como la resolución.

No obstante, es importante señalar que aunque los analizadores de masas mencionados son los más usados hasta hoy en la mayoría de los equipos comerciales, se ha desarrollado y comenzado aplicar en los últimos años un tipo de analizador de masas, que basa la separación de las especies iónicas en un principio totalmente diferente. Este es conocido por sus siglas en inglés como "TOF mass analyzer" (Time Of Flight), el cual fue el primero en usarse en el acoplamiento CG– MS, aunque sin éxito por entonces.

En este tipo de analizador las especies iónicas se conducen a un tubo llamado de deriva y son aceleradas hacia el detector mediante un potencial eléctrico adecuado a tal fin. Puesto que las especies iónicas que se originan en la cámara de ionización tienen distintas relaciones *m/z*, cada ión llegará al detector en un momento diferente. Los primeros en llegar serán los de menor masa y los últimos los de mayor.

La resolución en este tipo de analizador estará dada por la diferencia del tiempo de migración de cada ión, que como es lógico dependerá de su relación *m/z*. La resolución depende también de la longitud del tubo de deriva y del potencial (constante) aplicado, los cuales son aspectos tenidos en cuenta por el fabricante y optimizados por el.

En la actualidad la resolución de los analizadores de masa comerciales y las del tipo TOF son similares, obteniéndose rutinariamente valores del orden de 0,1 a 1 *Da*.

La detección. Cada especie iónica llega al amplificador electrónico y da una señal cuya intensidad dependerá de su abundancia relativa. La corriente generada por el flujo de iones proveniente del analizador de masas es muy débil del orden de 10^{-14} A. No obstante, a través de un amplificador electrónico alcanza valores aptos para ser medidos con exactitud.

Hay varios tipos de detectores comerciales en uso desde el punto de vista analítico la información eléctrica puede ser adquirida de dos modos distintos. En

uno de ellos se monitorea todas las masas producidas en la cámara de ionización (ión molecular, fragmentos y productos de reacción). Se obtiene un gráfico tridimensional donde un eje corresponde al tiempo de retención, otro a la abundancia iónica relativa y el tercero a la masa de cada fragmento. Este modo es usado en la identificación de compuestos con la ayuda de los ficheros de espectros de masas.

En el otro modo se selecciona previamente las masas o fragmentos que se desean medir. Este procedimiento es conocido por SIM. Es mucho más sensible y selectivo y los espectros son más fáciles de interpretar.

Como resultado del análisis por espectrometría de masas se obtiene un espectro de masas, que es un gráfico compuesto de muchas líneas, cada una de las cuales se corresponde con los diferentes fragmentos obtenidos y detectados, en función de su relación masa/carga (*m/z*). En el eje de las ordenadas (y) aparece el % de abundancia de cada uno de estos fragmentos.

La figura 10.8 muestra un espectro de masas de la Vitamina D_3

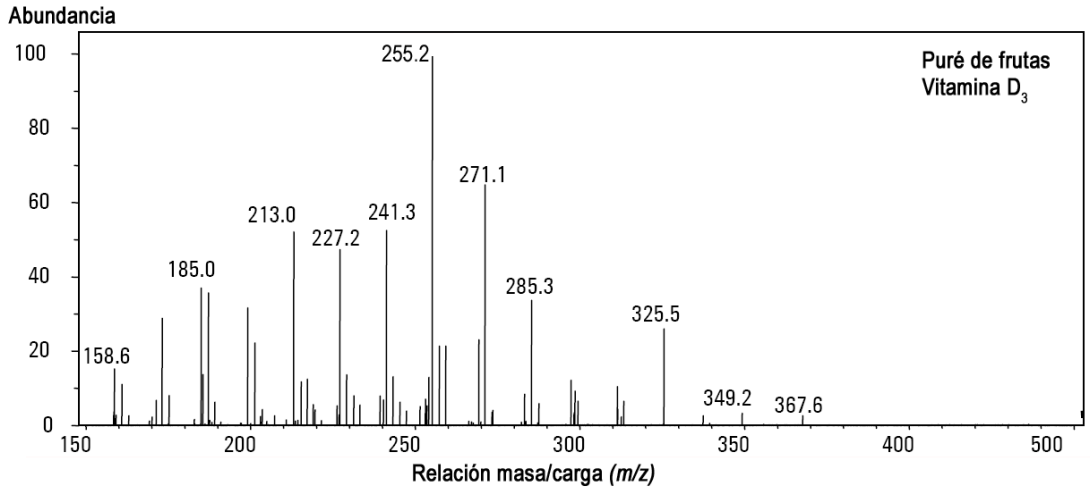


Figura 10.8. Espectro de masa obtenido para la Vitamina D_3 (colecalciferol)

Obviamente el espectro de masas de una especie brinda importante información cualitativa sobre esta, pues el número de fragmentos obtenido, así como los valores de la relación m/z de los mismos está íntimamente relacionado con la estructura de la sustancia.

Con fines analíticos, en un sistema HPLC-MS se registra un cromatograma de corriente iónica total (TIC) contra el tiempo de retención. Puede también registrarse la corriente de un ión característico de cada componente de la muestra, contra el tiempo: este método se denomina SIM por sus siglas anglosajonas (selective ion monitoring).

Los análisis mediante el acople HPLC-MS son muy precisos. Por lo general se logra una precisión entre 1% y 10% de la desviación estándar relativa para concentraciones de decenas de *pg* a decenas de *ng*. Otra característica buena del acoplamiento HPLC – MS es su rango lineal grande, que como mínimo es de 10^4.

El acoplamiento HPLC – MS se aplica en la determinación de cualquier compuesto, si se dispone de este de una columna adecuada y condiciones tales, que permitan cromatografiarlo en un tiempo práctico. Así como es lógico, es necesario que la masa molecular de la muestra sea compatible con el analizador de masas del sistema que se disponga.

En la tabla 10.4 se resumen las características fundamentales de algunos detectores usados en HPLC.

Tabla 10.4
Características y uso de algunos detectores

Detector	Uso	LD	Linealidad	Observaciones
Refractométrico	Universal	μg/mL	10^3	
UV (λ fija)	Selectivo	ng/mL	10^4	Uso frecuente
(UV–visible) (λ variable)	Selectivo	ng/mL	10^3	Espectro de aplicación amplio
Fluorescencia	Selectivo	pg/mL	$10^3 - 10^4$	-
Electroquímico	Selectivo	pg/mL	-	-
Conductividad	Selectivo de iones	μg/mL-mg/mL	10^5	Para la detección de sustancias conductivas e iones
Dispersión de luz	Universal	μg/mL	$10^3 - 10^4$	Detección "on – column" para columnas de di ≅ 25 μm
Detector de fluorescencia en columna	Selectivo	fg/mL	10^3	Detección "on – column" para columnas de di ≅ 25 μm
Acople HPLC -MASA	Selectivo	ng/mL	10^4	Para flujos de 1 mL/min o menores

10.3.7. Sistema de registro y procesamiento de la información cromatográfica

Por lo general, la salida de la información producida por el detector ante el paso de la muestra a través de la celda de flujo, puede registrarse directamente valiéndose de un registrador convencional. Pero esto es ya algo que se está utilizando cada vez menos. La introducción de las PC y de los softwares especializados permite la captación de la información cromatográfica, su almacenamiento y procesamiento en el momento que se requiera. Los softwares especializados en cromatografía líquida le proporcionan al analista un número de herramientas que hacen más fácil, seguro y exacto su trabajo.

La posibilidad de comparar los cromatogramas de la muestra, de los patrones analíticos y los de los blancos correspondientes al análisis que se realiza es hoy tarea rutinaria en el análisis por HPLC.

El cálculo cuantitativo se facilita pues además de los tr, el sistema software – computadora almacena el área y la altura de cada pico significativo.

10.3.8. El colector de fracciones

Para trabajos preparativos en los que se requiere colectar las fracciones eluidas de la columna puede emplearse de modo opcional un colector de fracciones. El colector de fracciones se coloca después que la señal del detector ha sido registrada y de forma análoga a los automuestreadores, estos dispositivos son programables en cuanto al volumen y número de muestras a colectar en función del tiempo de análisis.

En la actualidad muchos equipos de HPLC se comercializan con un diseño modular muy atractivo que posee la ventaja adicional de brindar una mayor protección a cada uno de sus componentes (figura 10.9).

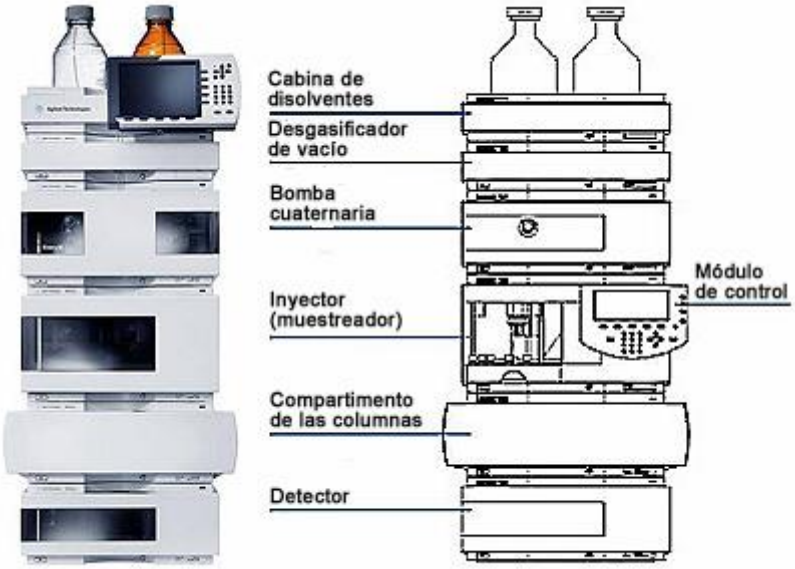


Figura 10.9. Diseño modular de un cromatógrafo líquido de alta resolución (HPLC) de la serie 1200, comercializado por la firma alemana Agilent Technologies

Por otra parte el desarrollo alcanzado por las microelectrónica ha conducido a la aparición de potentes aditamentos de pequeño tamaño capaces de monitorear todo el proceso cromatográfico (figura 10.10), en tanto el auge de las Tecnologías de la Información y las Comunicaciones (TICs) facilita el acceso a enormes bases de datos en línea que permiten la obtención de información cromatográfica de todo tipo.

Figura 10.10. Controlador Instant Pilot Agilent. Serie 1200 que proporciona pleno control instrumental y visualización de la señal en línea

10.4. MODOS DE OPERACIÓN EN HPLC

En líneas generales, los distintos tipos de cromatografía usados en HPLC pueden llevarse a cabo de modos muy diferentes.

10.4.1. Régimen isocrático

La forma más simple de realizar una determinación en HPLC es cuando todos los parámetros que influyen en la separación cromatográfica, permanecen constantes. Entre ellos tiene relevancia la composición de la fase móvil. En este caso el modo de operación se llama isocrático (de igual fuerza, en este caso, de elución).

Hay razones muy fuertes para usar, siempre que sea posible, el modo de operación isocrático:

- El equipamiento es más simple, menos costoso.
- El procedimiento es sencillo y relativamente rápido.
- El tiempo de la estabilización de la columna después de cada análisis es muy corto, en ocasiones no se requiere esta etapa.
- Los resultados son muy reproducibles y el procedimiento está poco influenciado por algunas impurezas en los solventes que originan problemas en otros modos de operación.

Sin embargo, la operación isocrática tiene inconvenientes y limitaciones. Así, por ejemplo:

- No puede usarse, cuando no es posible lograr que los componentes de una muestra tengan valores de K en el rango $0,5 < K < 20$.

- Es muy difícil obtener resultados adecuados (reproducibles), si la masa molecular de los componentes de la muestra es superior a 1000 Da. En estos casos, variaciones muy pequeñas en el porcentaje del modificador orgánico (% B), ocasionan grandes cambios en los tiempos de retención.
- Si las muestras que se analizan tienen impurezas con $K >> 20$, además de dañarse la columna, provocan dificultades en la interpretación y calidad de análisis sucesivos (eluyen en zonas evaluables de los cromatogramas siguientes).
- En ocasiones es muy difícil eliminar con medios isocráticos las colas de algunos componentes de las muestras.

Para dar solución a los problemas cromatográficos expuestos, se ha desarrollado algunos modos de operación en HPLC. En los epígrafes siguientes se describirá los tipos principales de programación en HPLC y se hará énfasis en la programación de gradiente (composición variable de la fase móvil), debido a la importancia que tiene esta variante tanto en HPLC analítica como en procesos preparativos a cualquier escala.

10.4.2. Programación de la composición de la fase móvil (gradiente de elución)

Este es el tipo de programación más usado en HPLC a pesar de que tiene algunas desventajas (equipamiento costoso, en especial la bomba, además requiere tiempo para reequilibrar la columna después de cada análisis, lo que implica un consumo mayor de fase móvil).

Además de las circunstancias que fueron señaladas en el epígrafe 5.5 que indican como opción la vía de programación en HPLC, en el caso concreto del gradiente de elución hay que añadir que se mejora sustancialmente la sensibilidad (los picos son la mitad del ancho y el doble de altos que en la separación correspondiente de forma isocrática).

Como ya se ha mencionado con anterioridad, en la cromatografía de gradiente de elución se utiliza como mínimo dos solventes. El solvente A es débil mientras que el solvente B es fuerte. El porcentaje de este segundo solvente se hace variar en función del tiempo, de modo de lograr la separación requerida.

Cuando se usa gradiente de elución es útil trabajar con el parámetro tiempo de gradiente (t_G), el cual mide el tiempo en que la fase móvil cambia desde A puro (100 %) hasta B puro (100 %) en forma lineal (figura 10.11). Por razones prácticas este cambio se expresa siempre en *% V/V.*

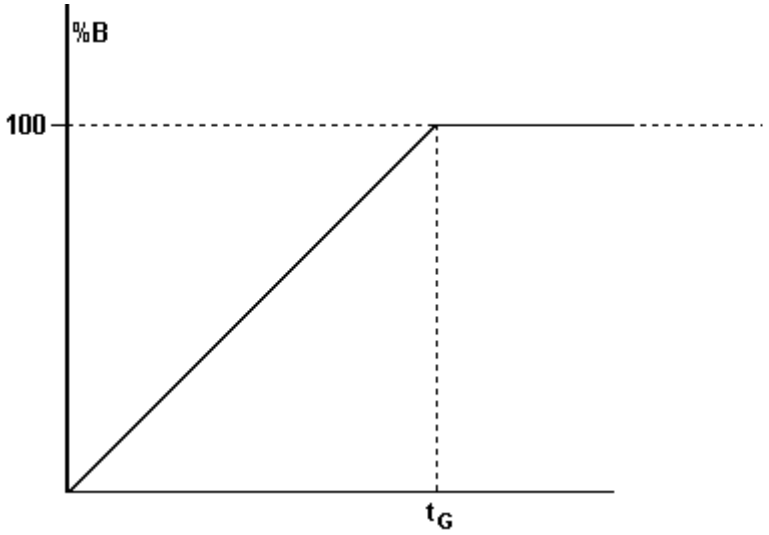


Figura 10.11. Incremento lineal del solvente B. Tiempo de gradiente (t_G)

10.4.2.1. La Elección de los Solventes A y B

Si el solvente A es más fuerte que el B, la utilización de gradiente de elución tiene un efecto adverso al deseado pues empeora el cromatograma. Si por el contrario A es muy débil mientras que B es demasiado fuerte, por lo general los componentes de la muestra se reúnen muy unidos, con poca resolución, en un punto del cromatograma. En este caso es aconsejable variar A (seleccionar otro A) hasta lograr que los picos con *tr* pequeño no se superpongan.

Si aún con el solvente A más débil los picos tienden a agruparse poco tiempo después de la inyección, entonces se requiere trabajar con una columna con un número de platos teóricos mayor (más larga) o cambiar el tipo de fase estacionaria hasta lograr el objetivo requerido.

La elección del Solvente B reviste una particular importancia en los sistemas de gradiente. El parámetro t_G es muy útil en su selección pues si cuando se alcanza el tiempo t_G, no han eluido aun todos los componentes de la muestra, ello es indicativo de que es preciso incrementar la fortaleza de B.

10.4.2.2. Tipos de gradiente

Hay varias formas de realizar el gradiente de elución de acuerdo a la forma en que se varíe la concentración de B en función del tiempo. En este sentido los gradientes pueden ser lineales, logarítmicos y exponenciales. Los cromatogramas obtenidos al aplicar cada una de estas variantes poseen características diferentes.

El gradiente lineal es aquel en el cual el porcentaje de B varía linealmente en función del tiempo lo que produce de forma general un cromatograma cuyos picos son equidistantes y tienen anchos en las semialturas muy similares (figura 10.12).

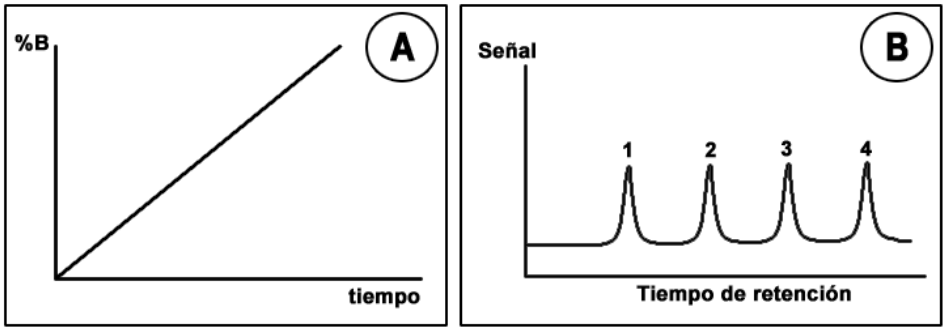


Figura 10.12. Gradiente lineal: (A) representación gráfica, (B) cromatograma característico.

Cuando se hace crecer B de forma logarítmica en función del tiempo el cromatograma resultante se caracteriza por el hecho de que los picos con *tr* pequeños son más estrechos que los de *tr* mayor y se produce además un incremento entre las distancias entre picos a medida que aumenta el *tr* (figura 10.13)

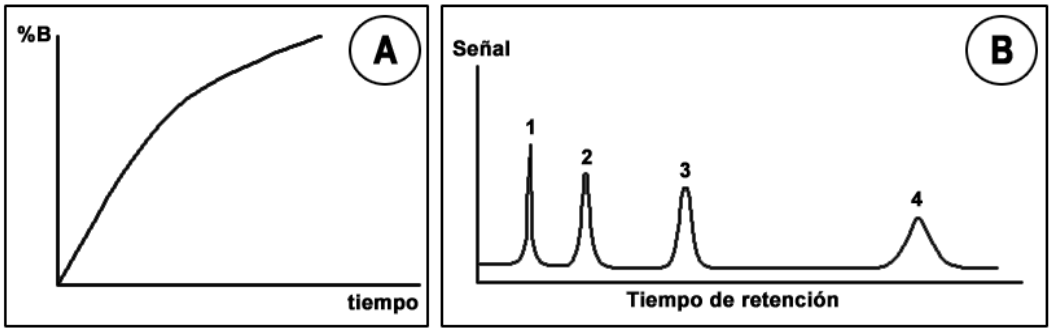


Figura 10.13. Gradiente logarítmico: (A) representación gráfica, (B) cromatograma característico.

Finalmente, si la concentración de B se hace crecer exponencialmente en función del tiempo, el cromatograma resultante presenta picos que van siendo mayores, más estrechos y con menores distancias entre dos consecutivos tal como se muestra en la figura 10.14.

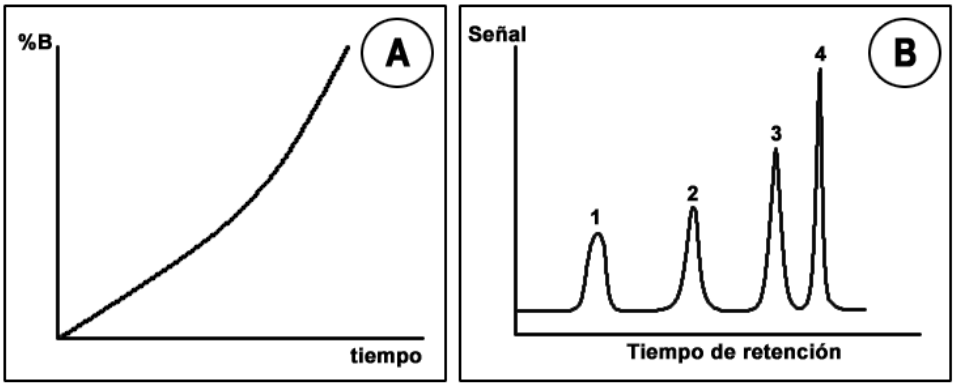


Figura 10.14. Gradiente exponencial: (A) representación gráfica, (B) cromatograma característico.

Cada una de las tres formas de realizar el gradiente de elución tiene sus ventajas y su campo de aplicación.

La programación lineal se usa para casos normales, Sus resultados son muy buenos, especialmente la calidad de sus cromatogramas. En ellos hay casi la misma resolución para los picos con tr pequeños que para los que tienen tr grandes.

En el caso del gradiente logarítmico mejora la resolución para los picos con tr grande, pero hay pérdida de sensibilidad. Mientras que con el gradiente exponencial ocurre todo lo contrario: los compuestos de mayor tr salen más finos, con menos resolución, pero se gana en sensibilidad.

Un aspecto que es general para cualquier forma de realizar el gradiente de elución está relacionado con la capacidad de carga de la columna. Si se trabaja isocráticamente la sobrecarga de la columna (un tamaño excesivo de muestra) se manifiesta por una disminución de los tr así como del número de platos teóricos. La sobrecarga es mayor, en igualdad de condiciones, para los componentes de la muestra con mayores valores de K.

Esto se pone de manifiesto cuando se analiza una mezcla de varios analitos, todos con la misma concentración. Si esa concentración es tal que se satura la columna para el componente con menor tr, esa misma concentración sobresatura los demás componentes (con tr mayores).

Esto no se presenta cuando se trabaja con gradiente de elución. En este caso, como que K decrece con el gradiente, la columna no se sobrecarga. Tampoco es frecuente ver picos con colas cuando se trabaja con gradiente, puesto que la zona posterior de este está en contacto siempre con una fase móvil más fuerte que la de su frente.

Por las razones expuestas, es frecuente que los trabajos preparativos en HPLC (a cualquier escala) se realicen con gradiente de elución.

10.4.3. Programación de flujo o presión de la fase móvil

Este es un tipo de programación sencillo. Puesto que los tr de los componentes de una muestra son inversamente proporcionales al incremento de la presión (o del flujo correspondiente) si se programa éste, acorde a una cierta ley (incremento lineal, exponencial), se logrará un cromatograma más corto, con las ventajas que esto conlleva.

En la actualidad y con el uso de software especializados, es factible hacer una programación de presión acorde a una necesidad analítica concreta.

Aunque el método no requiere una estabilización del sistema posterior al análisis, se usa poco pues tiende a compactar el relleno de la columna si se usa repetidamente.

10.4.4. Programación de temperatura

Este tipo de programación requiere como es natural disponer de un horno con regulación de la temperatura. El efecto del incremento de la temperatura sobre la separación cromatográfica tiene que ver con la modificación de las constantes de distribución de los solutos.

Pero además de la disminución de los tr que esto lleva aparejado, y debido al efecto que tiene la fase móvil en la HPLC:

- Se mejora la capacidad de muestra (la columna admite una muestra de mayor tamaño sin saturarse)
- Disminuye progresivamente la viscosidad de la fase móvil, aumenta la permeabilidad del relleno y en consecuencia la presión necesaria para mantener un flujo preestablecido es cada vez menor.

Desde el punto de vista práctico, es necesario programar también la temperatura de la fase móvil que entra a la columna. Para ello basta con introducir en el horno de 0,5 *m* – 1 *m* del tubo conductor de la fase móvil.

10.5. TRATAMIENTO DE MUESTRAS PARA HPLC

La etapa de la preparación de la muestra es una etapa crítica en cualquier método analítico y de ella depende en gran medida el éxito de la determinación.

A pesar de que el objetivo de la cromatografía es precisamente la separación de los componentes de una mezcla y de la formidable fortaleza de HPLC para la separación de mezclas de altísima complejidad, está técnica no está exenta de necesitar un cuidadoso tratamiento de las muestras debido a que la impurezas y contaminantes presentes en la matriz original pueden entorpecer la eficiencia de la separación y lo que es peor dañar la columna cromatográfica.

De cualquier modo, el objetivo de la etapa de preparación de la muestra es el mismo que para cualquier método analítico, es decir, extraer el grupo de compuestos a cromatografiar del modo más eficiente posible, en ausencia de sustancias interferentes.

Para ello pueden emplearse métodos de extracción convencionales tales como extracciones sucesivas con disolventes (en función de la polaridad de los compuestos de interés) y posterior concentración del extracto, procedimientos de destilación, reflujo, clarificación, digestión, e incluso la aplicación de la cromatografía en columna convencional como un paso previo a la inyección en HPLC; pero estos procedimientos tienen la desventaja de consumir grandes cantidades de solventes y matrices así como largos tiempos de análisis, con vistas a garantizar porcentajes de recuperación adecuados.

En los últimos años han surgido otras técnicas que permiten un tratamiento de las muestras menos laborioso y más eficiente. A continuación, se expondrán brevemente dos de las más empleadas en la actualidad: la extracción en fase sólida y la microextracción en fase sólida.

10.5.1. Extracción en fase sólida

La extracción en fase sólida (SPE, del inglés *Solid Phase Extraction*) es una excelente opción en la preparación de muestras para análisis por cromatografía de una enorme gama de componentes presentes en los alimentos (grasas, proteínas, aminoácidos, azúcares, vitaminas, etc.), con la ventaja de que requiere de pequeñas cantidades de muestras y solventes orgánicos, así como cortos tiempos de análisis en comparación con otras técnicas clásicas de tratamiento de muestras.

El método consiste en hacer pasar la muestra a través de unas pequeñas columnas cromatográficas, llamadas también cartuchos de SPE, rellenas de un soporte que contiene la fase estacionaria con la cual interactúan los componentes de la muestra (figura 10.15).

El objetivo de este procedimiento es la separación del grupo de compuestos (que posteriormente serán analizados por HPLC o cromatografía de gases), de otros sustancias contaminantes o interferentes presentes en la muestra, que pudieran dificultar la posterior separación o incluso dañar la columna cromatográfica. Para ello debe existir una diferencia apreciable de afinidad por la fase estacionaria entre los compuestos de interés y las interferencias; así, la purificación y/o extracción de estos componentes en SPE puede ocurrir de dos formas diferentes:

1. Las sustancias contaminantes interactúan con la fase estacionaria y los componentes que se desean extraer eluyen rápidamente sin interaccionar con ésta y se recogen para su posterior separación cromatográfica.
2. Los componentes que se desean extraer quedan en la fase estacionaria mientras que las sustancias interferentes eluyen. En este caso habría que hacer pasar con posterioridad a través del cartucho SPE un solvente adecuado para eluir los compuestos de interés y recogerlos para su análisis.

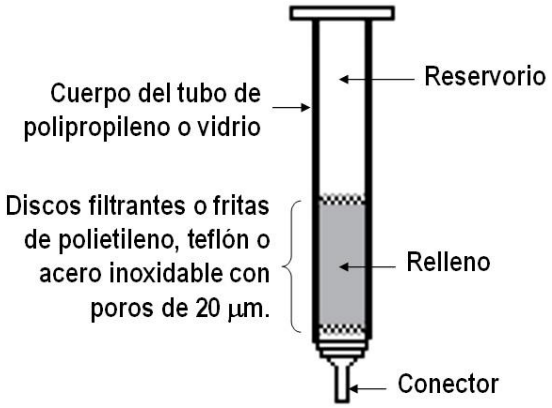


Figura 10.15. Cartucho de extracción en fase sólida

En la actualidad se comercializan cartuchos SPE desechables de vidrio o material polimérico que se usan para remover contaminantes o para realizar fraccionamientos previos. Esta técnica es altamente selectiva y versátil debido al gran número de fases estacionarias introducidas en los últimos 15 años; además

de la conocida sílica gel, se emplean cartuchos SPE de fase ligada (amino, diol, ciano), fase ligada reversa (C-8 y C-18) y fase ligada de grupos siloxano y amino cuaternario para intercambio iónico.

Las tablas 10.5 y 10.6 muestran dos procedimientos de SPE para la preparación de muestras lipídicas.

Tabla 10.5

Extracción de la fracción de esteroles en aceites

ETAPA	ACCIÓN
A	Saponificación de la muestra (0.25-0.50 g aceite + 5 ml 0.5 mM KOH alcohólico, 20 min a reflujo, 80ºC)
B	Adición de betulina como estándar interno (1 mL de betulina en 5 mL de cloroformo
C	Ajustar pH y filtrar (HCl 5 M, filtro de membrana de nylon 0.45 mm)
D	Pasar a través de cartucho C18

Tabla 10.6

Elución combinada de colesterol oxidado usando columnas SPE de sílica y NH_2

ETAPA	ACCIÓN
A	Columna SPE de sílica (300mg/3ml); acondicionada con 3 ml hexano
B	Aplicación de la muestra
C	Elución con 10 ml n-hexano/eter etílico (95:5,v/v); 25 ml n-hexano/eter etílico (90:10),15ml n-hexano/eter etílico (80:20, v/v), vacío 29 kPa, flujo 0.6 ml/min v/v]
D	Elución de colesterol oxidado con 5 mL de acetona
E	Concentración del eluato a 1ml de n-hexano/eter etílico (90:10), v/v
F	Aplicación en columna SPE NH_2
G	Elución con 15 ml n-hexano/eter etílico (90:10), v/v
H	Elución de colesterol oxidado purificado con 10 mL de acetona

10.5.2. Microextracción en fase sólida

La microextracción en fase sólida (SPME, del inglés *Solid Phase Micro Extraction*) es una técnica de preparación de la muestra en la que se emplea muy poca cantidad de disolventes. El principio de funcionamiento es muy similar a la extracción en fase sólida (SPE), pero aquí la fase estacionaria está contenida en un finísimo capilar (de diámetro interno en el orden de los micrómetros), que sustituye a la aguja de una jeringa especial. La figura 10.16 muestra un esquema de la jeringa con el capilar que contiene la fase estacionaria

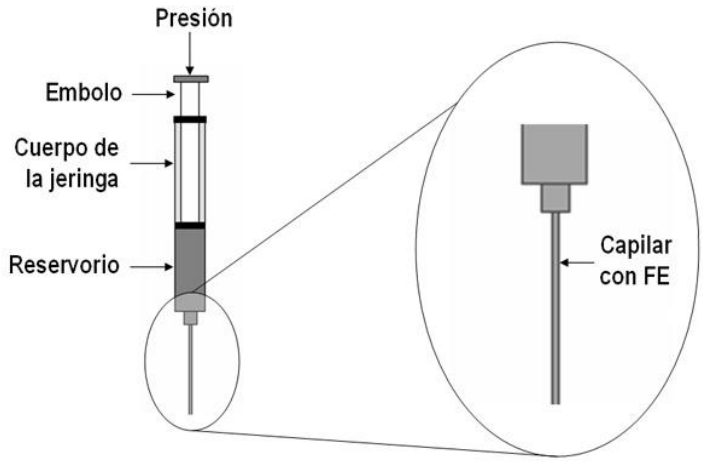


Figura 10.16. Jeringa con el capilar contentivo de la fase estacionaria

El procedimiento general consiste introducir un volumen de muestra en la jeringa y ejercer una presión controlada sobre el émbolo con ayuda de una bomba. La muestra se adsorbe en fase estacionaria y los eluatos se desechan. Posteriormente se repite el procedimiento con una solución de lavado para terminar de eluir las interferencias que no interactuaron con el adsorbente y nuevamente los eluatos son desechados. Finalmente se hace pasar un disolvente que actúa como fase móvil y eluye el o los compuestos de interés, los cuales quedan listos para el análisis por HPLC.

En la figura 10.17 se muestra un esquema de un procedimiento SMPE aplicable a muestras de mieles, leche y huevos, para la posterior determinación de cloranfenicol por HPLC. En este caso se empleó un capilar cuyas dimensiones fueron 2 cm x 530 nm, contentivo de un polímero monolítico como fase estacionaria.

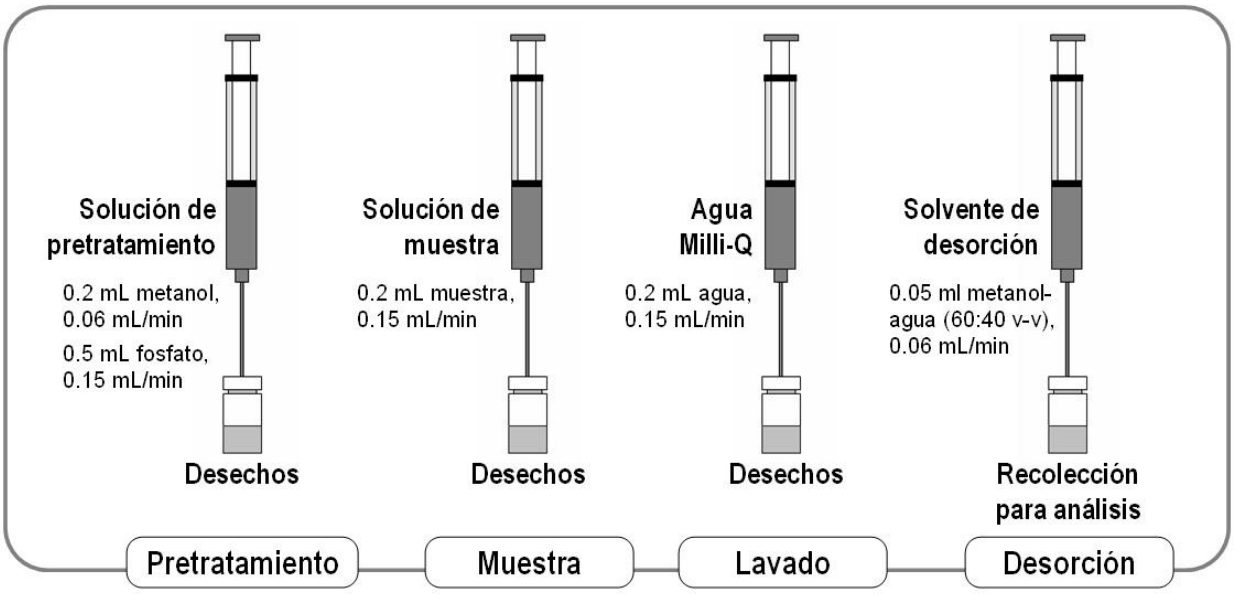


Figura 10.17. Extracción de cloranfenicol el mieles, leche y huevos utilizando microextracción con polímeros monolíticos (ácido metacrílico-dimetilcrilato de etilenglicol)

10.6. APLICACIONES ANALÍTICAS DE HPLC

El objetivo del análisis por HPLC es el mismo que el de cualquier otro tipo de análisis cromatográfico, esto es, lograr la separación lo más completamente posible de los constituyentes de una mezcla, para luego identificarlos y cuantificarlos por algún medio apropiado. En este aspecto HPLC es muy buena pues las separaciones que se logra con ella son excelentes. En los demás métodos de análisis conocidos, se precisa separar los constituyentes de una mezcla (incluidos como tales también las impurezas), para con posterioridad identificarlos y/o cuantificarlos. En cuanto a la rapidez del método no es necesario insistir mucho. Así por ejemplo a principios del pasado siglo uno de los grandes químicos de la época, Emil Fischer, desarrolló un método para analizar hidrolizados de proteína, el cual requería por lo menos una semana de trabajo para su terminación. Actualmente el análisis de un hidrolizado de proteína por HPLC es tarea de unas pocas horas.

Es premisa en todo análisis obtener un grado satisfactorio de aislamiento de los componentes de la mezcla a analizar. El trabajo se facilita mucho cuando se supone o conoce el origen de la muestra o la posible presencia de algunos constituyentes particulares.

Para llevar a cabo una separación por HPLC es preciso tener en cuenta dos factores importantes: la naturaleza físico-química de la columna y las condiciones de operación del equipo.

De importancia en cualquier separación cromatográfica es la naturaleza de la FE. De la elección acertada de ésta depende en gran medida el éxito del análisis. Cuando no se dispone de datos sobre la naturaleza de la muestra a analizar, es preciso hacer análisis de tanteo con fases estacionarias de naturaleza químico-físicas diferentes, con vistas a elegir entre ellas la que presente las mejores características.

Una vez elegida la FE es preciso tener presente todos los parámetros que afectan la eficiencia de una columna, los cuales han sido discutidos en detalle al tratar sobre la ecuación de Van Deemter y que como es lógico, no es necesario repetir aquí. Solo es preciso señalar que aun eligiendo los parámetros óptimos para una separación, los resultados pueden ser pobres o insatisfactorios, si no se ha procedido correctamente al impregnar el soporte con la FE; si con posterioridad no se empaquetó correctamente el relleno en la columna; si el acondicionamiento de ésta fue inadecuado, etc. En resumen, los mejores resultados se obtienen solamente cuando todos los pasos requeridos para la preparación y puesta en operación de una columna cromatográfica han sido realizados teniendo en cuenta los principios e indicaciones dados en párrafos anteriores.

Condiciones de operación

Los parámetros de operación fundamentales son la composición de la fase móvil, el sistema de elución empleado y la velocidad de flujo.

En HPLC, la composición de la fase móvil y el sistema de elución empleado (isocrático o de gradiente) juegan un papel esencial en el proceso por cuanto determinan la fuerza con que la misma va a arrastrar a los solutos durante el proceso de separación y por tanto su capacidad de solubilizarlos con mayor o menor facilidad influye grandemente en la eficiencia de la separación.

En relación a la velocidad de flujo se sabe que existe un flujo óptimo para cada constituyente, pero la mezcla se cromatografía a un flujo de compromiso. En cada caso particular habrá que variar el flujo y observar el efecto que esta variación produce sobre la resolución.

Finalmente es preciso considerar la concentración de la muestra y el volumen de esta a inyectar. La cantidad de cada componente inyectado debe encontrarse dentro del rango lineal de respuesta del detector. De no ser así debe realizarse diluciones hasta satisfacer este requisito. Además, el volumen a inyectar debe ser el menor posible.

10.6.1. Análisis cualitativo

Para identificar los componentes de una mezcla separados por HPLC se utilizan diversos métodos, los cuales pueden ser cromatográficos y no cromatográficos. Los métodos de identificación basados en las propiedades cromatográficas son relativamente rápidos y sencillos en sus principios. Tienen sin embargo sus limitaciones. Así, por ejemplo, si se mide el tr y el ancho de la altura media de un compuesto desconocido y no coinciden con los valores respectivos de un patrón X cromatografiado bajo idénticas condiciones, se puede afirmar categóricamente que el producto desconocido no es X. Pero si al realizar las mediciones de tr y ancho en la altura media se encuentra una buena concordancia entre los valores respectivos del patrón X y del compuesto desconocido, (teniendo en cuenta el error normal de medición), no se puede afirmar que sean la misma especie química. Hay sin embargo una buena probabilidad de que sean el mismo compuesto; la probabilidad aumentará a medida que se use otros métodos de identificación (cromatográficos o de otro tipo).

Es claro que el conocer el origen de la muestra facilita el trabajo. Si se sabe que un cultivo se trata con insecticidas fosforados y al analizar una muestra de tomate se presenta un pico con igual tr, ancho en altura media, etc, que el malathion debemos darnos por satisfechos y aceptar que la sustancia desconocida corresponde al referido insecticida.

En una identificación de rutina, en la que se use un detector selectivo, es suficiente la coincidencia de dos o tres parámetros cromatográficos para dejar

sentada la identidad de un compuesto, si se dispone además de datos sobre el origen de la muestra.

Una identificación más rigurosa se requiere cuando se tiene poca información sobre la matriz y sobre su composición. En este caso es necesario, como es lógico, más trabajo sobre la muestra. En primer lugar, hay que hacer selectiva la identificación desde las etapas preliminares del análisis, esto es desde la extracción y limpieza. De ser posible habrá de usarse métodos que permitan separar los analitos en grupos. La información derivada de los métodos de partición y elución selectiva en columna es muy valiosa para ayudar a interpretar los resultados cromatográficos. Además de estos métodos, ha de usarse identificaciones por capa delgada, de ser posible con revelados selectivos. Se completa el trabajo recogiendo el compuesto separado cromatográficamente en una trampa adecuada y sometiéndolo a identificación adicional por UV, IR u otra técnica adecuada.

De cualquier modo, en el análisis de los alimentos el análisis cualitativo se realiza de forma general con fines corroborativos pues la inmensa mayoría de los componentes presentes en los alimentos se conocen, así como también se sabe a priori la procedencia de las muestras y se cuenta con un gran número de patrones de referencia de estos compuestos.

A continuación, se describen los métodos más empleados para el análisis cualitativo en el caso de matrices alimentarias.

10.6.1.1. Comparación de los tiempos de retención

Es un método muy sencillo que consiste en comparar los tiempos de retención obtenidos para un pico cromatográfico de una muestra cromatografiada, con el tiempo de retención obtenido para un patrón de referencia de la sustancia que se sospecha esté presente en la muestra.

Es útil cuando se dispone de patrones analíticos y se conoce la procedencia de la muestra. Se analiza ésta y aquellos bajo iguales condiciones, preferentemente alternando la inyección de la muestra con la de los patrones y, con las limitantes ya conocidas, la igualdad de tiempos de retención entre muestra y patrón es un buen indicio de identidad.

Los tiempos de retención publicados en la literatura no deben usarse como criterio de identificación. Esto se debe a que el tr depende de numerosos factores (naturaleza y porcentaje de FE, longitud y diámetro interno de la columna, velocidad de flujo, entre otros) y no es posible reproducir las mismas condiciones en otro laboratorio, máxime cuando el porcentaje de FE es variable en función del tiempo, ya que ésta varía paulatinamente.

10.6.1.2. Anchura en la altura media

La anchura del pico de un analito medido en la mitad de la altura es una característica distintiva de este. Así, cuando un compuesto desconocido presenta el mismo tiempo de retención que un patrón analítico y además sus anchuras

respectivas en la semialtura son iguales, se puede afirmar con mucha probabilidad de no equivocarse, que ambos son la misma sustancia. Si para tiempos de retención iguales de muestra y patrón las anchuras respectivas son diferentes, se puede descartar definitivamente la igualdad. Debe recordarse que el proceso de ensanchamiento de una banda cromatográfica es muy complejo y está determinado por numerosos factores, la mayoría de los cuales depende de la naturaleza físico-química del soluto que se cromatografía. Es lógico que si dos compuestos tienen naturalezas físico-químicas distintas, sus ensanchamientos respectivos sean diferentes.

10.6.1.3. Enriquecimiento de pico

Es una variante de la comparación de los tiempos de retención. En este caso una vez cromatografiada la muestra, se añade a esta una cierta cantidad de patrón de referencia del compuesto que se sospecha esté presente. La muestra con el patrón adicionado se vuelve a cromatografiar y si uno de sus picos aumenta su área es indicativo que se corresponde con el patrón adicionado. Si por el contrario aparece un nuevo pico en el cromatograma puede afirmarse que el patrón de referencia no se corresponde con ninguno de los componentes presentes en la muestra.

10.6.1.4. Utilización de un detector con arreglo de diodos

El empleo de un detector espectrométrico UV-Vis con arreglo de diodos brinda enormes posibilidades para la identificación de compuestos por cuanto, además de ofrecer información sobre los tiempos de retención de los componentes y por tanto ser sensible a la aplicación de los métodos de identificación anteriormente mencionados (comparación de los tiempos de retención, anchura en la altura media y enriquecimiento de pico), este detector es capaz de realizar un barrido en un amplio rango de longitudes de onda a cada uno de los componentes eluidos obteniendo el espectro de absorción de cada uno.

El uso de computadoras y software especializados permiten en la actualidad almacenar una enorme cantidad de espectros en bibliotecas digitales llamadas espectrotecas y realizar comparaciones con los espectros obtenidos por el detector de cada uno de los componentes cromatografiados lo que permite realizar el análisis cualitativo basado no solo en las propiedades cromatográficas de los eluatos sino también, en sus características espectroscópicas.

La figura 10.18 muestra un gráfico en tercera dimensión donde se relacionan los tiempos de retención y los espectros de absorción de una mezcla compleja.

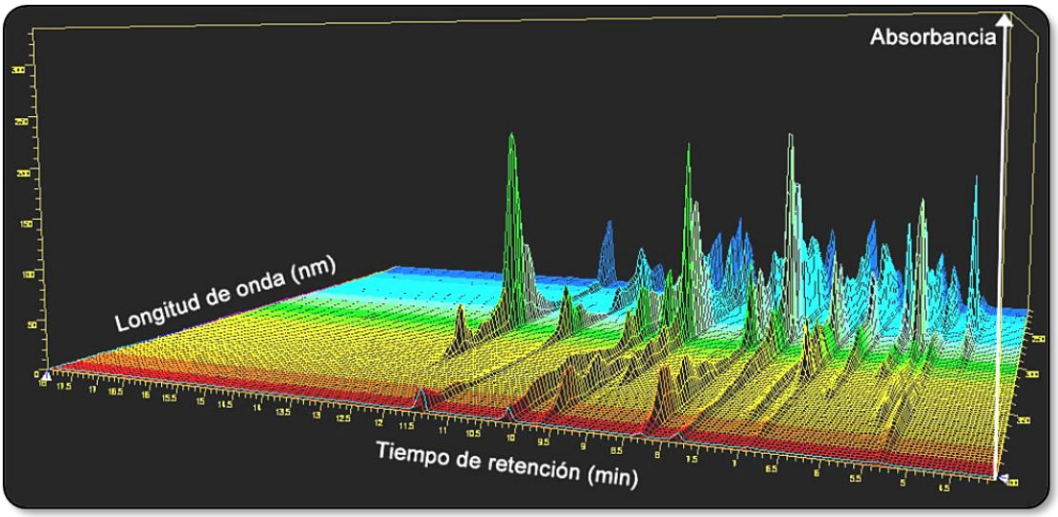


Figura 10.18. Gráfico tridimensional de una mezcla compleja obtenida con un detector de arreglo de diodos.

10.6.1.5. Acoplamiento en línea de HPLC con técnicas espectroscópicas

En la actualidad están tomando mucho auge un grupo de equipos analíticos que constan de un cromatógrafo acoplado a un espectrómetro de masas (MS) o a un equipo de resonancia magnético nuclear (RMN). Estos equipos son muy costosos, aunque las ventajas que brindan son innegables por cuanto aprovechan al máximo las inigualables potencialidades de estos métodos espectroscópicos en la identificación de prácticamente todo tipo de compuestos.

En la actualidad es posible disponer comercialmente de cromatógrafos líquidos de alta eficiencia acoplados a espectrómetros de masas (HPLC–MS), como equipos compactos, en los cuales el espectrómetro de masas se ha convertido en un detector muy valioso en la identificación y cuantificación. De forma análoga al detector con arreglo de diodos el uso de computadoras y software especializados permiten en la actualidad almacenar una enorme cantidad de espectros de masas en espectrotecas y realizar comparaciones con los espectros obtenidos por el detector de cada uno de los componentes cromatografiados, sin que el analista tenga que ser un especialista en espectrometría de masas para arribar a conclusiones sobre la composición cualitativa de los compuestos cromatografiados.

10.6.1.6. Colección de analitos eluidos e identificación por técnicas espectroscópicas, de microanálisis y por cromatografía de capa delgada

La colección de los componentes separados por HPLC de una mezcla compleja puede realizarse automáticamente colocando un colector de fracciones al final del sistema cromatográfico. Una vez colectada la cantidad requerida del analito o analitos de interés, los mismos se analizan mediante métodos espectroscópicos tales como la espectrometría de masas (MS), la espectroscopia infrarroja (IR) o

la espectroscopia de resonancia magnético nuclear (RMN) aprovechando las potencialidades de los mismos como métodos de identificación.

Las técnicas de microanálisis generalmente están muy bien establecidas y pueden aplicarse con éxito para la identificación de los solutos separados y aislados por los procedimientos descritos. La especificidad de estos métodos de identificación es muy grande, razón por la cual se han desarrollado mucho en los últimos años.

Finalmente, el uso de la cromatografía de capa delgada en la identificación cualitativa puede tener lugar tanto en el extracto que se inyecta en el cromatógrafo como en los compuestos eluidos y aislados por los métodos descritos. La cromatografía de capa delgada tiene un gran poder de separación, por lo que en la mayoría de los casos puede prescindirse de la separación por HPLC y se identifica el extracto directamente por este procedimiento.

10.6.2. Análisis cuantitativo

La aplicación de HPLC al análisis cuantitativo tiene sus premisas, sin las cuales los resultados son poco valiosos o erróneos. Sin que el orden siguiente implique la importancia, las premisas fundamentales de todo análisis cuantitativo por cromatografía líquida de alta resolución son:

- Los picos a evaluar han de corresponder a una sola especie química. Es por tanto importante que la separación haya sido eficiente. Picos con colas o frentes difusos amplios o con costados ligeramente deformados pueden enmascarar el resultado cuantitativo. Es importante que la simetría del pico de una muestra dada sea igual al del patrón correspondiente, cosa esta a veces difícil de lograr, especialmente cuando se analiza extractos vegetales, material biológico, etc., en los cuales pueden existir interferencias menores que afecten la simetría.
- La segunda premisa del análisis cuantitativo tiene que ver con la respuesta del detector. Esta tiene que ser lineal dentro del rango de concentraciones. Este rango se determina previamente para cada compuesto o componente de una mezcla con el detector que se vaya a usar en el análisis, utilizando patrones puros. Si al analizar la muestra ésta se encuentra por encima del rango lineal de respuesta, es preciso diluirla hasta que una nueva inyección caiga dentro del rango. Como ya se señaló al tratar los detectores, es conveniente determinar el rango lineal midiendo las áreas de los picos.
- Las condiciones de operación han de ser constantes. Esto quiere decir que durante la realización del análisis debe permanecer invariable la velocidad de flujo, la naturaleza de la fase móvil y el sistema de elución empleado, el tipo de columna y los parámetros operacionales del detector.
- La repetibilidad en la inyección de la muestra ha de ser buena. La introducción de la muestra ha de ser rápida, siempre igual y tener muy presente inyectar los mismos volúmenes de muestra y patrón. La razón es

sencilla. El ancho del pico cromatografiado depende de la duración de la inyección, de la temperatura y de la cantidad de muestra inyectada. Es también imprescindible usar el mismo solvente para diluir la muestra y los patrones.

En esencia, la cuantificación por HPLC se basa en la correspondencia lineal que hay entre la concentración o la cantidad de soluto presente en la muestra inyectada (y que pasa por el detector en un momento dado) y el área o la altura del pico correspondiente.

Así, la cuantificación de un pico cromatográfico puede realizarse según los criterios siguientes:

- Usando la señal máxima (altura máxima de pico) como una medida de la cantidad o concentración.
- Utilizando la señal integrada del detector (área del pico) como una medida de la cantidad o concentración.

En realidad, siempre que se pueda, la señal a elegir debe ser el área del pico por cuanto su proporcionalidad con la concentración no se ve afectada por el fenómeno de ensanchamiento de pico, lo que si ocurre con la altura. Sin embargo, cuando los picos son estrechos, la evaluación es más exacta y sencilla si se miden solamente sus alturas. El error que se introduce al medir la anchura (en la base o en la semialtura) de un pico estrecho es siempre considerable.

En la actualidad el procesamiento de la información cromatográfica se realiza mediante computadoras y software cromatográficos especializados, los cuales captan y almacenan la información que brinda constantemente el detector.

Esta información comprende las áreas, alturas y tiempos de retención de todos los picos de un cromatograma correspondiente a una muestra dada, el cromatograma completo y otros datos de interés. Esos softwares permiten además realizar operaciones tales como: comparación de cromatogramas (muy útil para el trabajo cualitativo) y determinaciones de concentraciones. El analista puede en cualquier momento y con una rapidez extraordinaria, disponer de esa información tabulada y/o graficada.

Los métodos de cuantificación de muestras dependen fundamentalmente del objetivo que se persiga y del tipo y característica de la muestra particular. A continuación, se describirán los procedimientos de mayor empleo.

10.6.2.1. Método de la curva de calibración

Es posiblemente el método de cuantificación más empleado en HPLC. Consiste en preparar varias soluciones de un patrón de referencia del analito (PR) a concentraciones crecientes y exactamente conocidas e inyectarlas individualmente bajo las mismas condiciones cromatográficas que se emplearon para obtener el cromatograma de la muestra.

Los cromatogramas obtenidos de los PR contendrán un solo pico de igual tiempo de retención (pues se trata del mismo componente bajo las mismas condiciones cromatográficas) pero los valores de área irán aumentando en la medida que aumente su concentración.

En la figura 10.19 Se muestra un esquema simplificado de este procedimiento, así como los cromatogramas obtenidos.

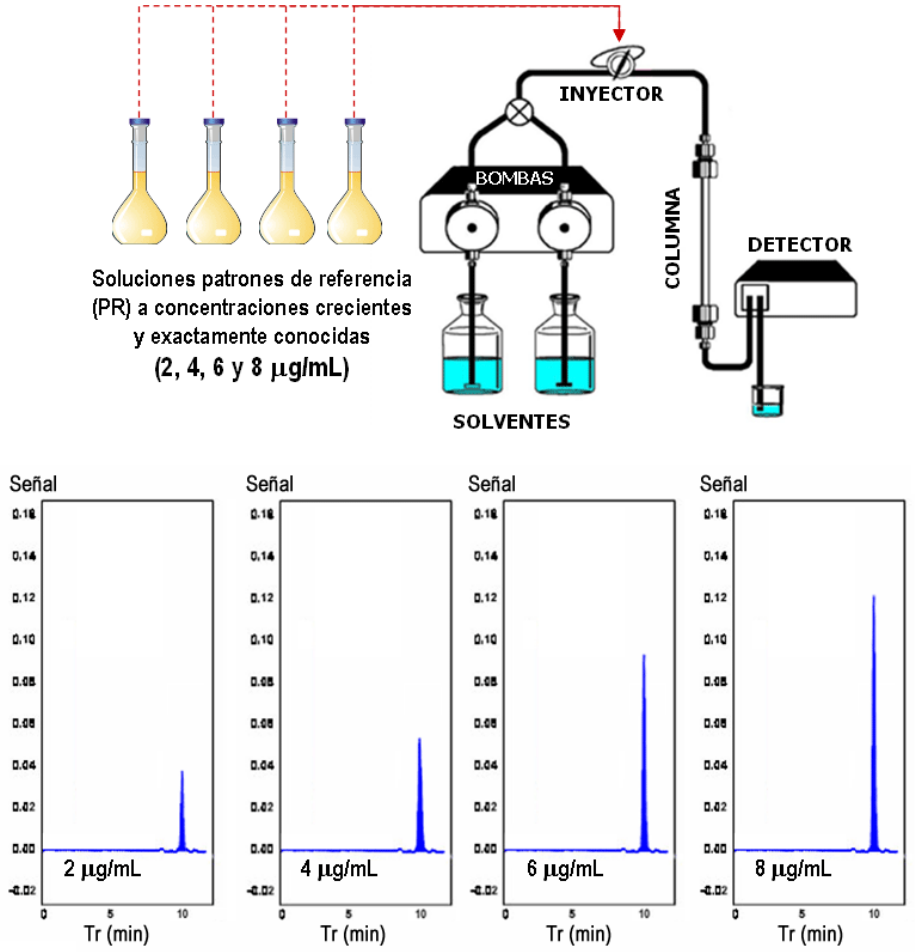


Figura 10.19. Esquema del procedimiento de curva de calibración

El equipo integra las áreas obtenidas en cada cromatograma y con estos resultados se obtiene una data de área (o altura) de los picos de los PR vs. concentración (o masa) de los PR. Esta data se procesa por regresión lineal y se obtiene una ecuación del tipo:

$$y = mx + a$$

donde:
m es la pendiente
a es el intercepto
x es la concentración (o la masa) del analito en la muestra inyectada
y es el área (o la altura) del pico del analito en el cromatograma de la muestra

Se obtiene además el valor del coeficiente de determinación (R^2), que debe ser muy cercano a 1 (≅ 0.99) y es una medida de la linealidad y por lo tanto de la proporcionalidad entre el área (o la altura) y la concentración (o la masa), brindando información sobre la calidad del trabajo realizado.

Veamos un ejemplo:

Se requiere cuantificar con exactitud el contenido de Riboflavina en un extracto vegetal en el rango de 2.0 μg/μl a 10,0 μg/μl. Se preparan entonces soluciones conteniendo patrón de referencia (PR) de Riboflavina en las concentraciones 2,0 μg/μl; 4,0 μg/μl; 6,0 μg/μl 8.0 μg/μl y 10,0 μg/μl. Se inyectan volúmenes iguales de estas soluciones obteniéndose los resultados que se muestran en la tabla 10.6.

Tabla 10.6.

Valores numéricos del gráfico de calibración

Concentración de PR de Riboflavina (μg/μl)	**Área de PR de Riboflavina (*mm²*)**
2.0	187
4.0	399
6.0	601
8.0	814
10.0	995

Los resultados obtenidos se procesaron por regresión lineal obteniéndose la siguiente ecuación:

y = 101.55 x - 10.1
R^2 = 0.9993

Para el análisis de la muestra se inyecta el mismo volumen utilizado en las determinaciones del gráfico de calibración, obteniéndose un área de 862 *mm^2* para el pico correspondiente a la Riboflavina en la muestra. Este valor se lleva a la ecuación de regresión y despejando se obtiene una concentración de 8.59 μ/μl para la Riboflavina en la muestra, según:

$$x = \frac{862 + 10.1}{101.55} = 8.59\ \mu g / \mu l$$

10.6.2.2. Método del patrón externo

Es un método muy usado, especialmente en determinaciones rutinarias donde no se requiera mucha exactitud. No requiere del uso de una curva de calibración, pero hay que disponer de todos los patrones analíticos de los constituyentes presentes en la muestra. Con esta premisa, se inyecta el patrón de referencia del analito (PR) a una concentración exactamente conocida y con los datos de las áreas (o alturas) de los picos correspondientes al patrón de referencia y al componente objeto de cuantificación se plantea la siguiente regla matemática:

Área del patrón de referencia (A_{PR}) → m (PR)

Área del pico de interés en la muestra (A_M) → m (M)

entonces:

$$m(M) = \frac{A_M \,.\, m(PR)}{A_{PR}}$$

El método se ilustra con el ejemplo siguiente.

Se extrae 50 g de muestra vegetal para determinar el plaguicida methyl parathion. Después de terminado el procesamiento de la muestra, se diluye el extracto a 3.0 ml y se inyecta de éste 2 μl en el cromatógrafo, equipado con un detector adecuado, originándose un pico estrecho de 6 cm de altura. Posteriormente se inyecta 2 microlitros (μl) de un patrón de methyl parathion de 2 ng/μl que originan un pico de 8 cm. Se desea saber los ng/kg de methyl Parathión en la muestra.

Primeramente, calculamos número de ng de patrón inyectado según:

$$2\mu l \cdot \frac{2ng}{\mu l} = 4ng$$

Se establece entonces la relación matemática:

Altura del pico del patrón de referencia = 8 cm → 4 ng de PR

Altura del pico de interés en la muestra = 6 cm → m (M)

$$m(M) = \frac{6\,cm \,.\, 4\,ng)}{8\,cm} = 3\,ng$$

Esos 3 ng fueron tomados en 2 μl del extracto final. Por tanto, su concentración es 3/2 ng/μl = 1.5 ng/μl.

Si se multiplica la concentración hallada del extracto por su volumen, habremos determinado la cantidad de methyl Parathión en los 3 ml del extracto, esto es:

1.5 ng . 3000 μl = 4500 ng = 4.5 μg

Finalmente, la concentración se puede expresar en ppm según:

$$\mu g/g = mg/kg = ppm = \frac{4{,}5\ \mu g}{50\,g} = 0{,}09\ ppm.$$

El cálculo en base a áreas se realiza de modo análogo.

Finalmente es importante señalar que para la aplicación de este procedimiento se debe tener la garantía de que la concentración del patrón de referencia inyectado se encuentre dentro de un rango de linealidad con los valores de área o altura de los picos cromatografiados.

10.6.2.3. Método del patrón interno

Es un método muy exacto, de obligatorio uso cuando los resultados analíticos requieran de una gran confiabilidad. Este método posee la ventaja de compensar las pérdidas de analito que pueden producirse durante la inyección de la muestra o durante el proceso de separación antes de llegar al detector.

Supongamos que necesitamos cuantificar un analito M presente en una mezcla. Se dispone del patrón de referencia (PR) correspondiente a M (si no se tiene el patrón correspondiente a un componente de la mezcla éste no se puede determinar) y además se posee otro patrón, que llamaremos patrón interno (PI) de propiedades físico-químicas semejantes a la de la muestra M, pero que tenga un tiempo de retención diferente, aunque próximo a ésta, y que por supuesto no esté presente en la muestra.

De acuerdo al rango de respuesta lineal del detector, tanto para M como para PI (que debe conocerse previamente) se preparan soluciones en las cuales están presentes PR y PI. El patrón de referencia (PR) en concentraciones crecientes y exactamente conocida, mientras que el patrón interno (PI) tiene que tener la misma concentración en todas las soluciones (idéntica además a la adicionada a la muestra). Para 4 puntos de la curva, las concentraciones (en las unidades propias del problema particular) pudieran ser por ejemplo:

Punto	PR	PI
1	2,0	2,0
2	4,0	2,0
3	6,0	2,0
4	8,0	2,0

Estas soluciones se preparan a partir de los patrones puros de PR y PI, enrasándose al mismo volumen. Se inyectan entonces, individualmente y por separado, volúmenes iguales de las soluciones, bajo las mismas condiciones cromatográficas que se emplearon para obtener el cromatograma de la muestra.

Los cromatogramas obtenidos de los PR+PI contendrán 2 picos de diferentes tiempos de retención (pues se trata de dos compuestos). Los valores de área de los picos correspondientes al patrón de referencia (PR) irán aumentando en la medida que aumente su concentración, mientras que el área de los picos correspondientes al patrón interno (PR) se mantendrá constante puesto que su concentración en todas las soluciones inyectadas es la misma.

La figura 10.20 ilustra este proceso para el caso del ejemplo considerado.

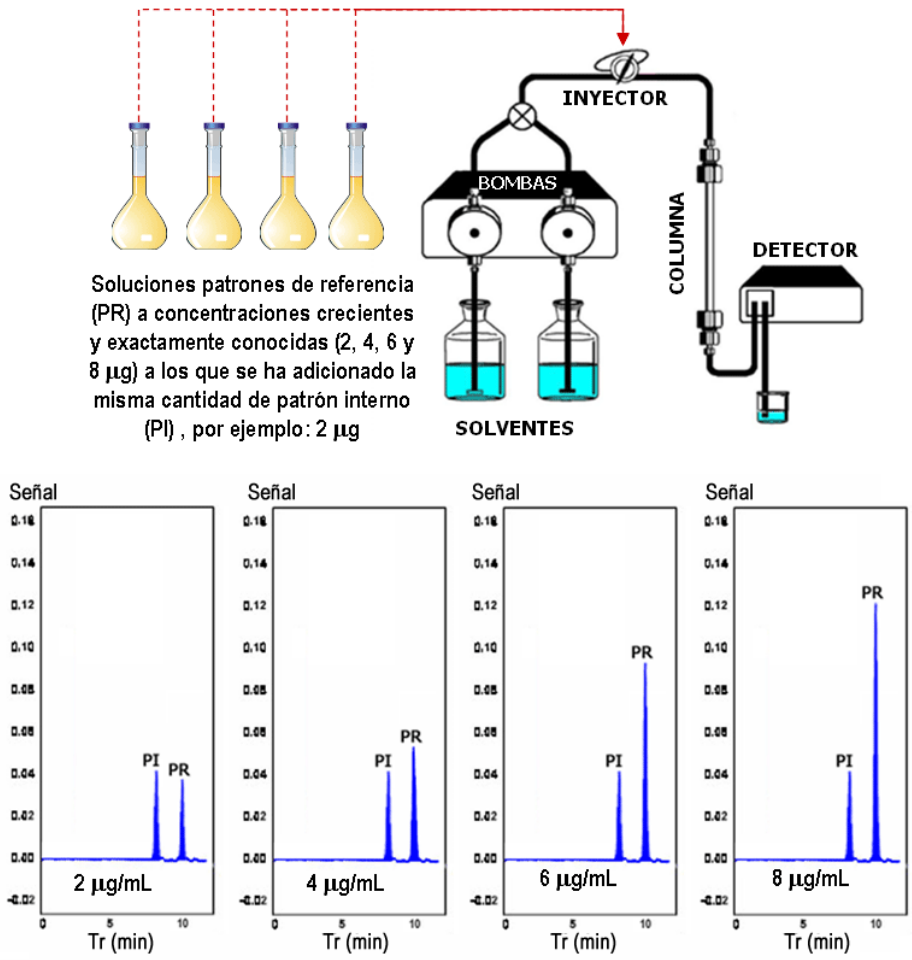


Figura 10.20. Esquema del procedimiento de curva de adición de patrón

El equipo integra las áreas obtenidas en cada cromatograma y con estos resultados se calcula para cada punto, el cociente de las áreas PR/PI. Así, se obtiene ahora una data de concentraciones de los patrones de referencia (PR) vs. las relaciones de áreas (A_{PR}/A_{PI}) obtenidas experimentalmente. Esta data se procesa por regresión lineal y se obtiene una ecuación del tipo:

$$y = mx + a$$

donde:
m es la pendiente
a es el intercepto
x es la concentración (o la masa) del analito en la muestra inyectada
y es la relación de área ($A_{PICO\ DE\ INTERËS}/A_{PI}$) en el cromatograma de la muestra

Cuando se va a analizar la muestra se añade a ésta la misma cantidad de patrón interno (PI) que fue usada para obtener los distintos puntos del gráfico de calibración y se enrasa al mismo volumen. Se inyecta de la muestra el mismo volumen que se usó para obtener los cromatogramas de calibración obteniéndose un cromatograma en que aparece un pico adicional, correspondiente al patrón interno (PI). La figura 10.21 ilustra este proceso.

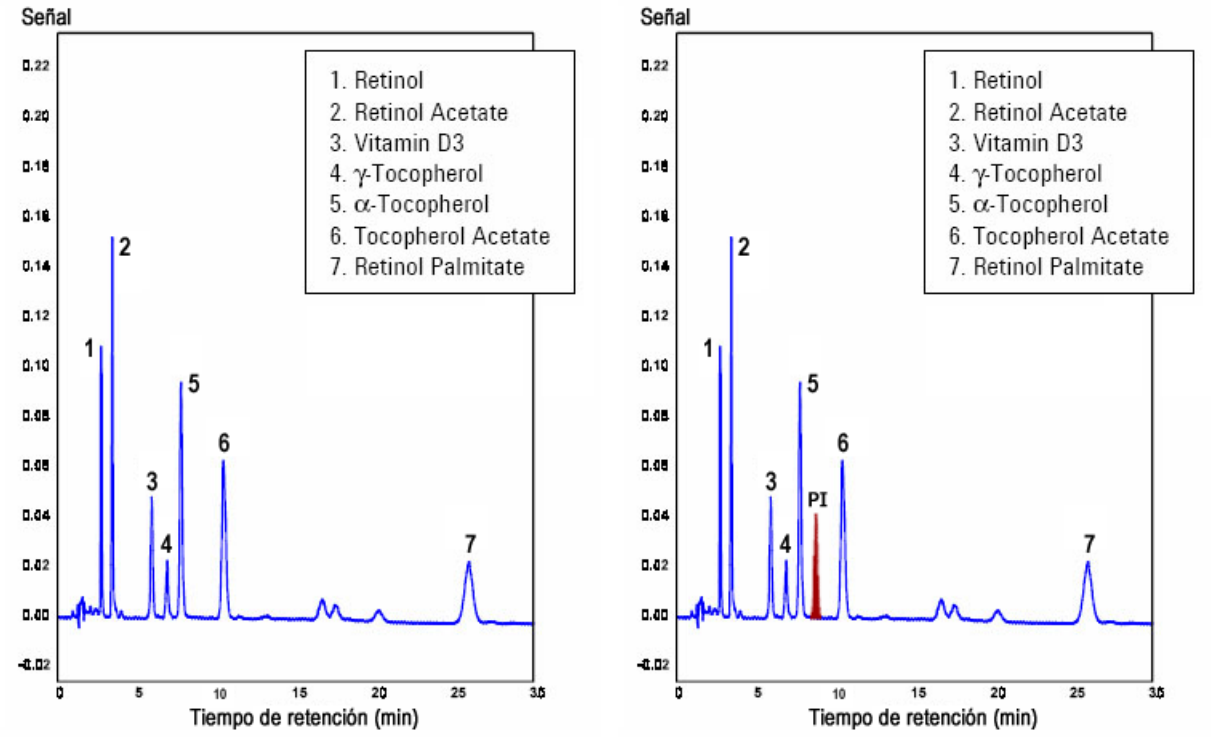


***Figura 10.21*.**

Cromatogramas de una mezcla de vitaminas. *A la izquierda, el cromatograma de la muestra sin adición de patrón interno (PI); a la derecha, el cromatograma con adición de PI a la muestra. Nótese la aparición de un nuevo pico entre los picos 5 y 6.*

Una vez obtenido el cromatograma de la muestra que contiene PI, se integran los picos de los componentes de interés y del PI de la misma forma usada en el caso del gráfico se calcula el cociente (Área del pico de interés en muestra/Área de PI). Este valor se sustituye en la variable *"y"* de la ecuación de regresión y despejando *"x"* se obtiene el valor de la concentración de la muestra, en la misma unidad de concentración con la que se prepararon las soluciones de calibración.

y = mx + a

$$x = \frac{y - a}{m} \text{ o sea } c\,(analito) = \frac{\frac{A_{PICO\ DEL\ ANALITO}}{A_{PI}} - a}{m}$$

Si la muestra tiene varios picos que se desea cuantificar, habrá que establecer para cada uno de ellos un gráfico de calibración del modo descrito, lo que resulta en extremo trabajoso. En estos casos, resulta práctico aplicar una variante más sencilla del método del patrón interno a la que llamaremos en este texto ***método del patrón interno simplificado***.

El proceso que se sigue es el siguiente:

En primer lugar se inyecta una mezcla de los patrones de referencia de los componentes previamente identificados cuyas masas son exactamente conocidas. Dicha mezcla contiene también una cantidad exactamente conocida del patrón interno. Para el ejemplo considerado con anterioridad de la separación de vitaminas, se obtendría un cromatograma con 8 picos (figura 10.22).

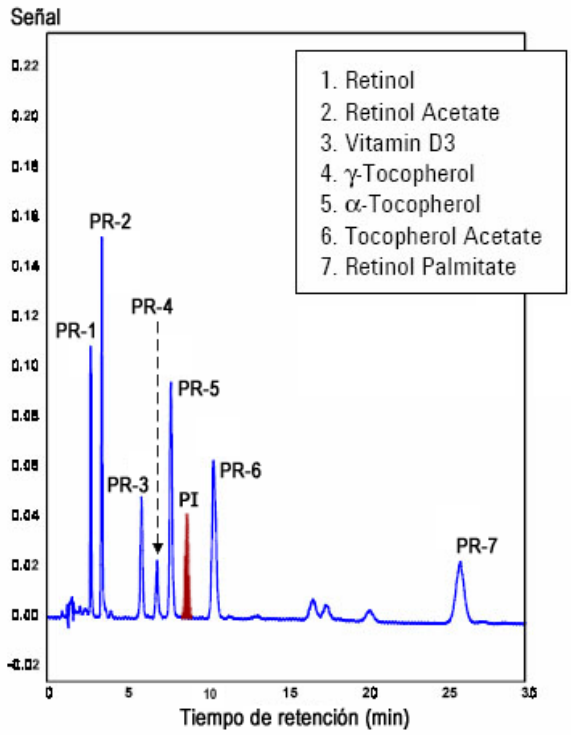


Figura 10.22. Cromatograma de la mezcla de los 7 patrones de referencia de las vitaminas (PR) y el patrón interno (PI)

Con los datos de masas y áreas de los patrones de referencia y el patrón interno se calcula un factor *f* (conocido como factor de respuesta del detector) para cada uno de los patrones. El factor de respuesta emerge de la siguiente relación:

$m_{PR1} \longrightarrow A_{PR1}$

$m_{PI} \longrightarrow A_{PI}$

entonces,

$$f_1 = \frac{m_{PR1}}{A_{PR1}} \cdot \frac{A_{PI}}{m_{PI}}$$

Aplicando el mismo procedimiento para cada uno de los patrones se obtendrían un total de 7 factores de repuesta según:

$$f_2 = \frac{m_{PR2}}{A_{PR2}} \cdot \frac{A_{PI}}{m_{PI}}, \quad f_3 = \frac{m_{PR3}}{A_{PR3}} \cdot \frac{A_{PI}}{m_{PI}}, \quad \ldots\ldots \quad f_7 = \frac{m_{PR7}}{A_{PR7}} \cdot \frac{A_{PI}}{m_{PI}}$$

donde: $\boldsymbol{m_{PI}}$ y $\boldsymbol{A_{PI}}$ es la masa del patrón interno y su área correspondiente; $\boldsymbol{m_{PR1}}$, $\boldsymbol{m_{PR2}}$, ... $\boldsymbol{m_{PR7}}$ y $\boldsymbol{A_{PR1}}$, $\boldsymbol{A_{PR2}}$, ... $\boldsymbol{A_{PR7}}$ son las masas y áreas respectivas de los patrones de referencia de cada componente.

Si se quiere determinar la cantidad de cada componente en una muestra cuya masa es P_m, se añade a ésta la misma masa de patrón interno utilizado para el cálculo de los factores de respuesta. Se cromatografía esta mezcla y se integran las áreas de los picos correspondientes a los componentes de la muestra ($\boldsymbol{A_M}$) y al patrón interno ($\boldsymbol{A_{PI}}$). La cantidad de cada componente se calcula según:

Para el pico 1

m del componente 1 ($\boldsymbol{m_{M1}}$) $\longrightarrow$ Área del pico 1 en la muestra ($\boldsymbol{A_{M1}}$)

m del PI ($\boldsymbol{A_{PI}}$) en la muestra $\longrightarrow$ Área del PI ($\boldsymbol{A_{PI}}$) en la muestra

así quedaría:

$m_{M1} = \frac{A_{M1} \cdot m_{PI}}{A_{PI}}$ y se multiplica por el factor calculado para el componente correspondiente al pico 1, según $m_{M1} = \frac{A_{M1} \cdot m_{PI}}{A_{PI}} \cdot f_1$

Este mismo procedimiento se emplea para determinar la masa de cada uno de los componentes de la mezcla usando en cada caso el factor de respuesta calculado para cada componente.

Nótese que a través de este método (*patrón interno simplificado*) no es necesario realizar una curva de calibración para cada componente a cuantificar, lo que conduce a un significativo ahorro de reactivos y de tiempo.

Cualquiera de los métodos del patrón interno explicados anteriormente, presenta como ventaja fundamental que, debido a que la determinación es relativa, se elimina el error de inyección, dependiendo la exactitud de la determinación del cuidado y exactitud con que se haya preparado el gráfico de calibración y la solución de la muestra. Así mismo, en este caso, pequeñas fluctuaciones en los parámetros de operación carecen de efecto medible sobre los resultados.

El método del patrón interno, es tanto más exacto cuanto más se ajuste el compuesto elegido como patrón interno a los siguientes requisitos:

- Debe estar relacionado estructuralmente con la muestra que se vaya a determinar.
- El pico del patrón interno debe encontrarse próximo al del compuesto que se vaya a analizar. Si la muestra tiene más de un compuesto, el P_i debe eluir aproximadamente hacia la mitad del cromatograma.
- La concentración del PI debe ser semejante a la de la muestra. En caso de una mezcla, este requisito no es fácil de satisfacer, pero al menos muestra y patrón han de poder determinarse con la misma atenuación del electrómetro.
- El PI no debe interactuar químicamente con los componentes de la muestra.

Veamos a continuación un ejemplo numérico:

Se requiere cuantificar con exactitud un compuesto M en el rango de 2,5 μg/μl a 10,0 μg/μl. Se conoce para este compuesto un patrón que llena los requerimientos de un patrón interno (PI). Se prepara entonces soluciones conteniendo patrón de referencia de M (PR_M) en las concentraciones 2,5 μg/μl; 5,0 μg/μl; 7,5 μg/μl y 10,0 μg/μl, mientras que en todas ellas PI tiene una concentración de 5,0 μg/μl. Se inyecta volúmenes iguales de estas soluciones obteniéndose los resultados que se muestran en la tabla 10.7.

Tabla 10.7.

Valores numéricos del gráfico de adición de patrón

Conc. de PR_M µg/µl	Conc. de PI µg/µl	Área (mm^2)		Relación Área PR_M/Área PI
		PR_M	PI	
2,5	5,0	340	590	0,576
5,0	5,0	653	565	1,156
7,5	5,0	958	552	1,735
10,0	5,0	1251	543	2,304

Los resultados obtenidos de µ/µl de PR_M vs. Área PR_M/Área PI se procesaron por regresión lineal obteniéndose la siguiente ecuación:

y = 0.2305 + 0.002
R^2 = 1

Para el análisis de la muestra se añade PI y cantidad suficiente de solvente de modo que la concentración de éste sea exactamente de 5,0 µg/µl. Se inyecta el mismo volumen utilizado en las determinaciones del gráfico de calibración, obteniéndose un área de PR_M igual a 538 mm^2 mientras que esta vez el patrón arrojó un valor de 572 mm^2.

La relación $\frac{538}{572} = 0.94$ se lleva a la ecuación de regresión, obteniéndose una concentración de 4.06 µg/µl para la muestra. Se recomienda que el lector analice con detenimiento las relaciones concentración de muestra-área; concentración PI –área y finalmente la relación área PR_M – área PI.

10.6.2.4. Método de normalización interna

Este procedimiento, también denominado método del área total, se aplica exclusivamente cuando cada uno de los componentes de una muestra compleja está representado por un pico en el cromatograma. Esto quiere decir que si la muestra consta de n componentes, su cromatograma deberá tener n picos resueltos. El porcentaje de cada componente en la mezcla se determina mediante la expresión:

$$\%\, componentey = \frac{A_y}{\sum_{y=1}^{y=n} Ay} \cdot 100$$

En donde A_y es el área de cualquiera de los n picos y $\sum_{y=1}^{y=n} A_y$ es la suma de las áreas de todos los picos. Si el detector usado respondiera igual ante todos los componentes de la muestra, el resultado del análisis de la mezcla sería satisfactorio. Pero en la práctica los detectores no responden igual ante compuestos diferentes. Para eliminar esta dificultad se ha introducido factores de corrección, los cuales se calculan para cada componente según la expresión:

$$f_y = \frac{P_y}{A'_y}$$

P_Y es la masa del constituyente y de la mezcla y A'_Y el área del pico de éste.

Si se usa los factores de corrección, la expresión para el cálculo sería:

$$\%\ componentey = \frac{f_y \cdot A_y}{\sum_{y=1}^{y=n} f_y \cdot A_y} \cdot 100$$

El método descrito es muy usado cuando se requiere determinar la composición relativa de una mezcla.

Ejemplo. Se desea conocer la composición de una mezcla que tiene cuatro constituyentes. Al analizar por HPLC están presentes en el cromatograma cuatro picos de áreas: a= 225mm^2; b= 375 mm^2; c= 250 mm^2; d= 150 mm^2.

La composición de la mezcla es la siguiente:

$$\sum \text{Áreas}\ a+b+c+d = 225+375+250+150 = 1000mm^2$$

$$a: \frac{225}{1000} = 0.225 \quad (22{,}5\%)$$

$$b: \frac{375}{1000} = 0{,}375 \quad (37{,}5\%)$$

$$c: \frac{250}{1000} = 0{,}25 \quad (25{,}0\%)$$

$$d: \frac{150}{1000} = 0{,}15 \quad (15{,}0\%)$$

Esta sería la composición de la mezcla en caso de que el detector responda igual ante los cuatro componentes. Si el detector no fuera ideal (por ejemplo un espectrómetro UV, en el que cada componente tiene un valor de λ_{max} diferente), habría que preparar una muestra sintética con cantidades conocidas de cada uno de los componentes y luego de analizadas por cromatografía, se determinarían con ella los factores f_y con lo que se aplicaría entonces la expresión correspondiente.

10.6.3. Límite de detección y límite de cuantificación

El *límite de detección (LD),* es la concentración más pequeña, que puede ser detectada por el método analítico con un grado aceptable de confiabilidad.

El LD está relacionado con la señal del compuesto y con el ruido en el momento, y con las condiciones cromatográficas con que se trabaja y por lo general es definido como el pico cuya relación señal/ruido es al menos de 3:1.

La forma más adecuada de disminuir el LD es mediante la reducción del ruido. En ocasiones el ruido depende de factores intrínsecos del detector y del sistema electrónico asociado. Este por lo general es un parámetro propio del equipo y depende de su calidad, asumiendo que no es debido a desperfectos.

Pero los factores que más inciden en la presencia del ruido en el cromatograma son las impurezas de los solventes, la contribución de la matriz de la muestra y en ocasiones el sangramiento de la fase estacionaria. Un análisis de trazas a niveles del orden de los μ/kg o inferior requiere de cuidados extremos: un local protegido de contaminación, incluso proveniente del aire (ambiente); cristalería limpia y un control rutinario de la contribución al ruido de los factores mencionados. Excepto la contribución de la matriz de la muestra, los demás pueden ser objeto de reducción y mantenimiento al mínimo práctico.

El *límite de cuantificación (LC)* es por su parte la concentración menor que puede cuantificarse de forma confiable con un nivel aceptable de exactitud y precisión.

El LC está igualmente relacionado con el ruido, de tal modo que se plantea que para poder cuantificar un pico de modo confiable, se requiere que la relación señal/ruido sea al menos 10. Para valores de concentración pequeños es importante conocer el LC y este carece de significación si la concentración de la muestra es grande.

En la figura 10.23 Se esquematizan los criterios para la determinación del límite de detección y cuantificación en función del ruido.

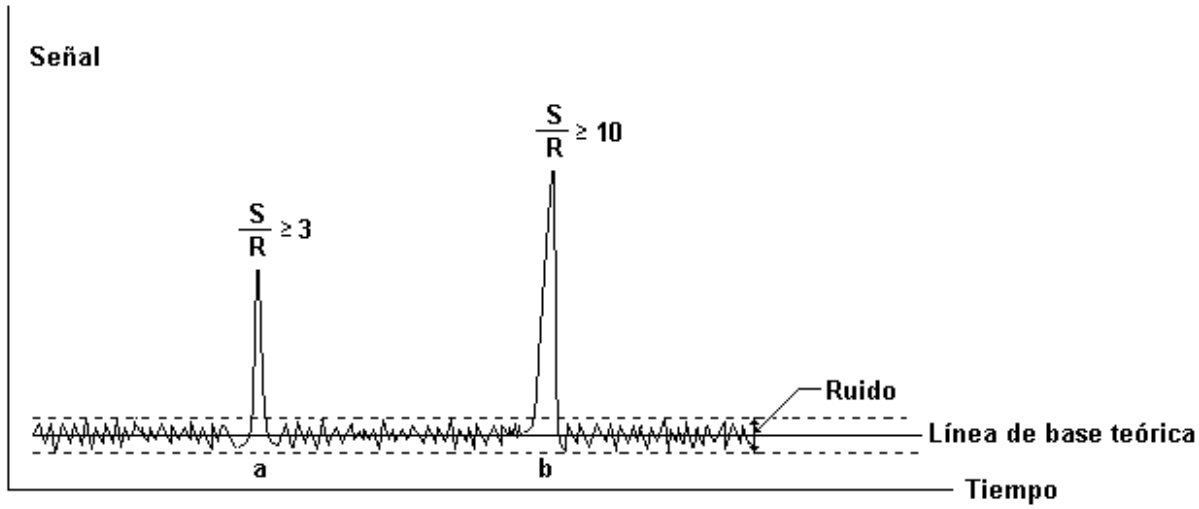


Figura 10.23. Criterios para la determinación del LD (a) y el LC

10.7. HPLC PREPARATIVA

El objetivo de este tipo de cromatografía líquida es el de obtener cantidades pequeñas de compuestos puros (*ng – mg*), utilizando el equipamiento analítico convencional, aunque no se excluye la posibilidad de uso de bombas, inyectores y columnas especiales.

Si es posible establecer unas condiciones cromatográficas tales que el compuesto de interés está bien separado de otros compuestos y/o impurezas, entonces puede aplicarse una sobrecarga a la columna y obtener así cantidades mayores del producto deseado.

Cuando la inyección de la muestra contiene 25 μg o menos (para una columna de 4,6 *mm* de diámetro interno), el ancho de la banda y el tiempo de retención no dependen del tamaño de la muestra. Si la inyección es mayor que el valor indicado, el pico se ancha, se distorsiona. El tamaño puede aumentarse gradualmente hasta que la banda de interés se aproxime (sin solaparse) con la banda del compuesto que la precede.

Por lo general es preciso disponer de las condiciones cromatográficas analíticas antes de intentar una separación preparativa. Además, se necesita conocer aspectos de la HPLC preparativa que ayudan a elegir adecuadamente el procedimiento a seguir. En los párrafos siguientes se expondrá estos aspectos, sin que el orden indique la importancia. Todos son sin duda importantes.

10.7.1. La fase móvil

Para obtener un producto puro es necesario eliminar la fase móvil de la fracción colectada donde se encuentra el compuesto de interés. Por ello es preferible siempre trabajar con la modalidad HPLC – fase normal, pues es mucho más fácil evaporar los solventes orgánicos que le son típicos, comparado con las fases móviles acuosas usadas en la cromatografía de fase reversa.

Además, si el objetivo es trabajar a una escala mayor, es importante también tener en cuenta que el gel de sílice no modificado es la fase estacionaria menos costosa, comparado incluso con los derivados ciano, diol y amino. Si se exceptúa la solubilidad ligera en las fases móviles básicas, el gel de sílice no tiene otro inconveniente.

De ser posible hay que evitar el uso de aditivos a la fase móvil que puedan hacer difícil el aislamiento puro del compuesto de interés (como tampones, sales del buffer). Si esto no fuera posible debe usarse aquellos aditivos que tengan mayor volatilidad (ácido acético, ácido fórmico, carbonato de amonio), los cuales son más fáciles de eliminar.

10.7.2. Solubilidad de la muestra en la fase móvil

Hay que tener en cuenta también la solubilidad de la muestra en la fase móvil. En HPLC analítica esto no es importante y se recordará que se recomienda en algunos casos inyectar la muestra en un solvente poco miscible en la fase móvil. Pero en HPLC preparativa se requiere una masa grande de muestra en el volumen menor posible de fase móvil. Esta es otra razón para elegir HPLC- fase normal, pues las fases móviles en cromatografía reversa no disuelven adecuadamente la mayoría de los compuestos orgánicos.

10.7.3. Importancia relativa del número de platos teóricos y el factor de selectividad

En HPLC preparativa el número de platos teóricos (n) y la selectividad (α) tienen una importancia relativa. Así cuando el tamaño de muestra que se inyecta es cada vez mayor, el número de platos teóricos se convierte cada vez más en una función de este y es más independiente de la longitud de la columna, del flujo de fase móvil y del tamaño de partículas del relleno. Eso permite trabajar HPLC preparativa con partículas de relleno grandes y con flujos elevados. Si con estas condiciones α es también grande para el compuesto de interés y su impureza más próxima, entonces se puede inyectar muestras mayores.

10.7.4. La masa de la muestra a inyectar

En la práctica, la masa máxima de la muestra para la obtención de fracciones puras en condiciones límites de resolución (próximas a la superposición de las bandas contiguas), se logra experimentalmente. Más adelante se verá que también puede hacerse un estimado teórico. Este tamaño máximo va a depender mucho de la naturaleza de la muestra y de las condiciones cromatográficas.

Así, si se logra aumentar α eligiendo adecuadamente los parámetros cromatográficos, entonces la masa máxima de muestra a inyectar puede ser grande. Acorde a la teoría, si α para una columna analítica de 250 *mm* x 4.6 *mm* es por ejemplo 1,05, la cantidad máxima de muestra debe ser ≤ 30μm. Pero si se logra modificar las condiciones de modo que se obtenga un valor de α= 3, entonces la cantidad de muestra máxima es 6 *mg* (2000 veces mayor) para la misma columna.

Un incremento de α por selección adecuada de las condiciones en HPLC, además de permitir un tamaño mayor de muestra cómo se indicó, hace posible trabajar con n pequeño (esto significa entre otras cosas, partículas de relleno de diámetros mayores y consecuentemente flujos de fase móvil más altos). Se reduce así el tiempo para cada corrida, o lo que es igual, se aumenta la productividad.

Esta es otra de las razones, además de las expuestas con anterioridad, de seleccionar el gel de sílice como relleno en la HPLC preparativa. Con él es posible lograr variaciones grandes de α con cambios pequeños en las condiciones cromatográficas.

10.7.5. Rendimiento

Como el objetivo de la HPLC preparativa es obtener producto puro, se define la velocidad de producción P_i como la cantidad Q_i separada en el tiempo t_{r_i}. Esto es:

$$P_i = \frac{Q_i}{t_{r_i}}$$

A su vez P_i puede expresarse en función de parámetros cromatográficos y las dimensiones de la columna:

$$P_i = A \cdot B \cdot u \cdot C \cdot D\left(\frac{1}{N} - \frac{h_o}{L}\right)^{1/2}$$

donde:

A = sección transversal de la columna

B = porosidad del relleno

u = velocidad lineal de la fase móvil

C= concentración de la muestra

D= relación entre el volumen inyectado V_i y σ_0, a su vez σ_0 mide la dispersión del volumen de muestra inyectado a la entrada de la columna. En la práctica se trata de lograr que σ_0 sea lo más pequeño posible

N = número de platos teóricos

h₀ = valor que toma h (altura del plato teórico) cuando V_i tiende a cero

L = longitud de la columna

Esta expresión, además del resultado cuantitativo, permite hacer un análisis cualitativo del efecto de cada uno de los factores que influyen sobre la velocidad de producción.

10.7.6. Alcance y requerimientos materiales de la HPLC preparativa

La HPLC preparativa puede ser de tres tipos acorde al objetivo que se persiga y los requerimientos materiales necesarios para llevarla a cabo.

A escala de laboratorio puede ser de dos tipos: HPLC preparativa con fines analíticos y/o con fines de obtener compuestos puros a pequeña escala para investigación o uso en el laboratorio. Cuando el objetivo es separar cantidades grandes se tiene la HPLC a escala productiva o comercial.

- La HPLC preparativa con fines analíticos se utiliza para separar componentes de una mezcla para ser usados en su identificación por vías no cromatográficas. En la actualidad, y con la introducción de las técnicas acopladas esta modalidad continúa usándose debido al costo elevado de esos equipos. Para lograr una separación con la finalidad indicada no se requiere equipo adicional (solo el analítico convencional). El diámetro de las partículas de relleno usable debe estar entre 3 μm y 10 μm. Por lo general se trabaja con presiones inferiores a 300 *bar*, mientras que los flujos no exceden de 10 *ml/min*. Las bombas analíticas en uso hoy alcanzan esa entrega. Las columnas pueden tener hasta 10 *mm* de diámetro interno y de 250 *mm* a 500 *mm* de longitud.

- La HPLC preparativa a escala de laboratorio persigue obtener cantidades del orden de los gramos de compuestos puros para realizar ensayos toxicológicos, determinación de estructura o simplemente para obtener patrones con un grado elevado de pureza. El diámetro de las partículas (casi siempre de gel de sílice) se encuentra entre 5 μm y 10 μm. Se trabaja con flujos desde 1 *ml/min* hasta 100 *ml/min*. Esto requiere bombas especiales, aunque la presión no excede los 100 *bar*. Las columnas usadas son de vidrio, con diámetros en el rango de 2,5 *cm* a 7,5 *cm,* y longitudes de 50 *cm* como máximo. Son columnas especiales para la finalidad indicada.
- A escala productiva, la HPLC preparativa usa columnas de vidrio y/o acero inoxidable, con diámetros internos desde 2,5 *cm* hasta 100 *cm* y longitudes entre 50 *cm* y 250 *cm*. Los rellenos usados casi exclusivamente son el gel de sílice, la alúmina y la celulosa. El tamaño de partículas es del orden de los 100 micrómetros. Las presiones de trabajo son en consecuencia, bajas. Por razones económicas y en dependencia de la separación que se lleva a cabo, con frecuencia se desecha el relleno después de usado, debido al costo elevado de los volúmenes de solventes requeridos para la regeneración de las columnas.

Trabajo Independiente

1. *Consulte los apéndices C-5, C-7 y C-8, en los que aparece un resumen de la instrumentación empleada en (HPLC) así como de los procedimientos de identificación y cuantificación utilizados en esta técnica.*
2. *Resuelva los ejercicios 13 y 14 que aparecen en el* ***Capítulo 14 / epígrafe 14.1. Ejercicios propuestos****.*
3. *Resuelva el ejercicio 1 que aparece en el* ***Capítulo 14 / epígrafe 14.2. Problemas integradores****.*
4. *Resuelva los ejercicios 3 y 4 que aparecen en el* ***Capítulo 14 / epígrafe 14.3. Análisis de documentación científica****.*

BIBLIOGRAFÍA.

1. Aparicio, R., Aparicio-Ruíz, R. (2000). Authentication of vegetable oils by chromatographic techniques. J. Chromatogr. A 881, 93-104.
2. Barceló D., G. Durand, R. J. Vreeken (1991). Evaluation of eluants in thermospray liquid chromatography – mass spectrometry for identification and determination of pesticides in environmental samples. J. Chromatog. 553, 311-328.
3. Catálogo. Knaver. Productos para Cromatografía Líquida (HPLC) (1999)

4. Cert, A., Moreda, W., Pérez, C. (2000). Chromatographic analysis of minor constituents in vegetable oils. J. Chromatogr. A 881, 131-148.

5. Chiron S., S. Dupas, P. Scribe and D. Barceló (1994). Application of on – line solid – phase extraction followed by liquid chromatography – thermospray mass spectrometry to the determination of pesticides in environmental waters. J. Chromatog. A 665, 295-305.

6. Cole L. A. and J. G. Dorsey (1990). Anal. Chem. 62, 16.

7. Dierksmeier, G. (2005). Métodos cromatográficos. Editorial Científico Técnica. Impreso por Impresol Ediciones Ltda. Bogotá, Colombia.

8. Flaherty B. O. (1993). "A practical guide to HPLC detection ".p 111. C. Parito ed. Academia Press. San Diego. CA.

9. Haddad P. R. and P. E. Jackson (1990). Ion Chromatography. Elsevier Ámsterdam.

10. Hennion, M.C. (1999). Solid-phase extraction: method development, sorbents, and coupling with liquid chromatography. J. Chromatogr. A 856, 3-54.

11. Huang, J-F, Zhang, H-J and Feng, Y-Q. (2006). Chloramphenicol Extraction from Honey, Milk, and Eggs Using Polymer Monolith Microextraction Followed by Liquid Chromatography-Mass Spectrometry Determination. J. Agric. Food Chem. 54, 9279-9286.

12. Kirkland J. J., C. H. Dilks and J. J. De Stefano (1993). J. Chromatography A 635, 19.

13. Kirkland K. M., D. A. Mc Combs and J. J. Kirkland (1994). J. Chromatography A. 660 pag 327.

14. Konikrom® V. 1.4. Referente Guide and User's Guide. Review (2002). Barcelona Spain.

15. Lercker, G., Rodriguez-Estrada, M.T. (2000). Chromatographic analysis of unsaponifiable compounds of olive oils and fat-containing foods. J. Chromatogr. A 881, 105-129.

16. Lewis J. A. D. C. Lommen, W. D. Raddatz, J. J. Dolan and R. L. Zinder (1992). J. chromatog. 592, 183.

17. Li G., E. Szule, D. H. Fisher and I. S. Krull (1997). "Electrochemical detection in liquid chromatography and capillary electrophoresis". P. T. Kissinger editor. Chromatog Science Series Marcel Dekker New York.

18. Liu H. and F. F. Cantwell (1991). Ion Pair High Perfomance Liquid Chromatography. Anal. Chem. 63, 993.

19. Lubke M., J. L. le Quere and D. Barron (1995). "Normal Phase Liquid Chromatography Principles". J. Chromatog. A 690, 41.

20. MALDI-TOFMS System. Technical Literatura. HP G2025A; Hewlett Packard, Burlington MA and San Jose, Ca.

21. Mc Donald P. D. and B. Bidlingmeyer. Chromatography ed. Elsevier Amsterdam p1 (1995)

22. Niessen M. A. and J. Van der Greef (1992). Liquid chromatography- mass spectrometry. Chromatographic Science. Series 58. Marcel Dekker. New York.

23. Panagiotopoulou. P. M. and Tsimidou M. (2002). Solid Phase Extraction: Applications to the Chromatographic Analysis of Vegetable Oils and Fats. Grasas y Aceites. Vol. 53. Fasc. 1, 84-95.

24. Parriot C. (1993). "A practical guide to HPLC detection". Page 2 256. C. Parriot editor. Academic Press. San Diego. CA.

25. Parriot C. (1993). "On column Light scattering detection in a practical guide to HPLC detection. C. Parriot. ed. Academic Press. San Diego.

26. Parriot C. (1993). UV detection in a practical guide to HPLC detection. Page 67. C. Parriot editor. Academic Press. San Diego. CA.

27. Ruiz-Gutiérrez, V., Pérez-Camino, M. C. (2000). Update on solid phase extraction for the analysis of lipid classes and related compounds. J. Chromatogr. A 885, 321-341.

28. Shoenmakers P. J. and R. Tijssen (1993). J. Chromatograpgy A 656, 577.

29. Snyder L. R. (1992). Chromatography 5th Edition. Elsevier. Ámsterdam.

30. Snyder L.R, J. J Kirkland and J.L Glajch (1997) "Practical HPLC Method Development", Second Edition, John Wiley and Son INC – New York., Chichester, Weinheim, Brisbane, Singapore, Toronto.

31. Volmer D. (1994). Thermospray HPLC-MS analyse von pestiziden in wässrigen Unweltproben GIT Fachzeitschrift für das Laboratorium 38 Jahrg Janvar 1/94. 16-24.

32. Volmer D. A. Preiss, K. Levsen und G. Wünsch (1993). Thermospray mass spectral studies of pesticides. Temperature and salt concentration effects on the ion abundance in thermospray mass spectra. J. Chromatog. 647, 235 – 259.

33. Znyder L. R, J. J. Kirkland and J. L. Glajch (1997) "Practical HPLC Method Development" John. Whiley and Sons. NY. Chichester, Weinheim. Brisbane, Singapore, Toronto.

11 Cromatografía de gases

11.1. Generalidades

Las primeras separaciones por cromatografía de gases fueron realizadas por Hesse y colaboradores en 1941, los cuales hicieron pasar una mezcla de compuestos orgánicos volatilizados a través de una columna empacada con gel de sílice. Surgía así la cromatografía gas-sólido, que fuera más tarde desarrollada por Cremer en 1951 y tuvo su impulso decisivo un año más tarde cuando Martin y James lograron separaciones en fase gaseosa utilizando el mecanismo de reparto; surgía así la cromatografía gas-líquido, ampliando extraordinariamente el campo de aplicación de la cromatografía de gases.

El impacto de esta técnica cromatográfica fue tan grande que ya en 1954 aparecieron los primeros cromatógrafos de gases en el mercado y en 1980 se estimaban en más de 200 000 el número de equipos en el mundo y en más de 30 000 las publicaciones del tema. En la actualidad la cromatografía de gases es la mejor opción para la separación de compuestos volátiles o volatilizables.

La cromatografía gaseosa es un método de separación físico aplicable a compuestos que puedan volatilizarse directamente o mediante la formación de un derivado adecuado. La difusión amplia y aplicación del método se basa en que permite una identificación y cuantificación rápida, simple y sensible de un grupo numeroso de compuestos de interés científico, económico o ambiental, a un costo moderado.

Todo tipo de cromatografía hace uso de dos fases, una de las cuales es estacionaria y la otra móvil. El soluto, llevado por la fase móvil a través de la fase estacionaria, interactúa con ésta y como resultado de esa acción recíproca será retardado en su avance, resultando la separación cromatográfica, ya que en general solutos diferentes no avanzarán con la misma velocidad. En el caso específico de la cromatografía gaseosa, la fase móvil es un gas y la estacionaria puede ser un sólido o un líquido que recubre a un sólido "inerte" de gran superficie. La primera posibilidad da origen a la cromatografía gas – sólido y la segunda a la cromatografía gas – líquido. Por su importancia y grado de aplicación se dedicará los siguientes epígrafes a la cromatografía gas – líquido (GLC, del inglés Gas Liquid Chromatography). Sin embargo, gran parte de los conceptos y principios que se expondrán son aplicables a la cromatografía gas – sólido.

11.2. Descripción del proceso cromatográfico

De forma muy simplificada puede decirse que el proceso consiste en impulsar, a una velocidad de flujo controlada, el gas portador a través de una tubería capilar

hasta una cámara de inyección a altas temperaturas donde se introduce la muestra que se desea analizar.

La muestra se introduce en ésta cámara por inyección a través de una membrana perforable, valiéndose de una microjeringuilla. La temperatura de la cámara y la capacidad calorífica de esta permiten un rápido paso a la fase de vapor, tanto del solvente usado en disolver la muestra como de los componentes sólidos de esta. Una vez en estado de vapor, la muestra es arrastrada por el gas portador, introduciéndola y llevándola a través de la columna cromatográfica, la cual se encuentra situada en un horno aislado térmicamente a temperatura entre 50^{o}C y 350^{o}C.

En la columna cromatográfica ocurre la separación de los componentes de la muestra en función de las diferencias en afinidad de los analitos por la fase estacionaria mientras son arrastrados por el gas portador.

A la salida de la columna se encuentra conectado el detector, el cual es un dispositivo capaz de responder a las pequeñas variaciones en las propiedades físicas del gas portador cuando se encuentra acompañado por el analito. En general cada detector está diseñado para responder ante una variación específica del gas portador, por ejemplo conductividad térmica, ionización, absorción electrónica, etc. Estas variaciones darán origen a otros tantos tipos de detectores.

La señal producida por el detector de naturaleza eléctrica o transformable en ella, es amplificada mediante un accesorio adecuado llamado electrómetro, que permite variar dentro de amplios márgenes la señal que envía al registrador donde se origina el cromatograma correspondiente de señal contra tiempo de retención. De forma análoga a la HPLC, la señal puede procesarse mediante un software especializado con las ventajas inherentes que brindan las Tecnologías de la Información y las Comunicaciones (TICs).

En la figura 11.1 se presenta un esquema correspondiente a un sistema de cromatografía de gases como el que se ha descrito en los párrafos precedentes.

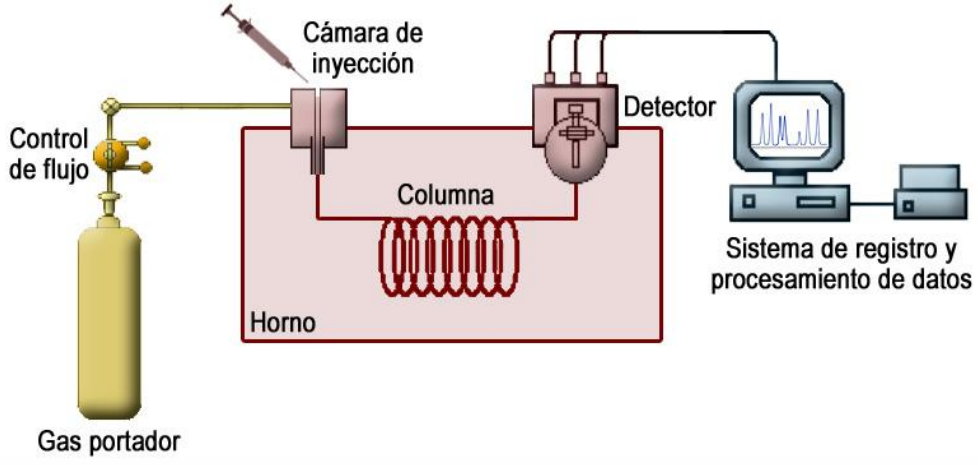


Figura 11.1. Esquema de un sistema de cromatografía de gases

11.3. EL CROMATÓGRAFO DE GASES

11.3.1. Los gases.

Los gases usados en la cromatografía a la cual han dado su nombre, están contenidos normalmente en recipientes o balones de acero con capacidad real de 20 litros - 50 litros. La presión a la que pueden estar sometidos los gases en los balones mencionados no debe sobrepasar de 200 kg/cm^2. Cada balón requiere de un manoreductor cuya función es la de entregar una presión constante y que en la mayoría de los casos no es superior a los 5 kg/cm^2. A través de tubos adecuados, los gases llegan a los puntos de entrada del cromatógrafo, pasando por filtros especiales antes de llegar a las válvulas que regulan con exactitud la presión de estos. En todos los cromatógrafos hay dispuestos manómetros, con ayuda de los cuales es posible fijar con exactitud la presión de trabajo de los distintos gases. En algunos equipos hay rotámetros que permiten leer directamente el flujo de gas que está entrando al cromatógrafo.

En la actualidad, con excepción de los gases nobles, los demás pueden generarse en el Laboratorio, usando equipos que dan una entrega adecuada para el trabajo, tanto de flujo como de presión. Además, la calidad es por lo general excelente.

Los gases cromatográficos son de dos tipos fundamentales: portadores y auxiliares.

A. Gases portadores

Los gases portadores comúnmente usados son los siguientes: Nitrógenos, Argón, Helio, Hidrógeno y CO_2.

La elección del gas portador que debe usarse en un trabajo determinado depende del tipo de detector que se vaya a usar. Así por lo general, para trabajar con un detector de conductividad térmica se requieren gases con valor alto de esta característica y la elección recaerá sobre el H_2 o He; para captura electrónica se usan Nitrógeno o Argón impurificado y con los detectores de ionización por llama se puede utilizar cualquiera de los gases arriba mencionados.

Justamente el problema más difícil que se puede presentar tiene lugar cuando para un detector dado sea posible usar más de un gas portador. En este caso la elección del gas habrá que hacerla tomando como base requerimientos técnico-económicos.

Si bien es cierto que hay una pérdida de eficiencia cuando se usa He en lugar de Nitrógeno o Argón, es también cierto que la velocidad óptima del gas portador es mayor en el primero respecto a los otros dos gases. Esto quiere decir que un análisis se realiza en menos tiempo cuando se usa He como portador que cuando se usa Nitrógeno o Argón, aunque con una pequeña pérdida de eficiencia.

En la práctica se trabaja dentro de un rango bastante amplio de velocidades sin que esto menoscabe apreciablemente la eficiencia cromatográfica. La razón para

ello es que el punto mínimo de la ecuación de Van Deemter se encuentra en una región bastante llana, de modo que variaciones apreciables de u apenas influyen sobre h, siendo esto tanto más acentuado cuanto mayor sea la densidad del gas portador.

En lo referente a las razones económicas, el precio de los distintos gases es muy variable y no se indicará cifras. Sólo es preciso señalar que el precio del He es elevado respecto a los demás gases, con el agravante de que se consume mucho más que de los otros. Es solo aconsejable su uso en conductividad térmica por razones de seguridad, o en casos especiales de separación, cuando se requiera un portador poco denso.

B. Gases auxiliares

Los gases auxiliares en cromatografía se usan para los sistemas de detección por ionización y en el detector fotométrico de llama. Para ambos casos se requiere Hidrógeno y aire. Estos gases, contenidos en recipientes como los descritos para los portadores, se conducen hasta el sistema de detección, luego de reducir su presión adecuadamente con los manoreductores apropiados. La presión de entrada al detector (y en algunos equipos el flujo) se indica en manómetros y/o rotámetros situados en el cromatógrafo.

Con relación al uso del Hidrógeno es preciso hacer algún comentario. En primer lugar él o los balones de hidrógeno no se deben situar dentro de un área de trabajo cerrada. De ser posible deben colocarse en lugares abiertos protegidos del sol y la lluvia. Si la ubicación del balón de Hidrógeno no puede ser la indicada, estando dentro del área del cromatógrafo, normalmente climatizada, es preciso entonces comprobar diariamente la fuga posible, valiéndose de una solución jabonosa. La hermeticidad del sistema neumático del cromatógrafo (desde la fuente hasta la salida del detector) se comprueba desmontando este último y sellando la salida al exterior con un eyector ciego. Se fija una presión de entrada al cromatógrafo de 2 kg/cm^2, cerrando de inmediato la válvula de acceso del gas que se va a comprobar. En estas condiciones debe mantenerse la lectura de la presión en el indicador correspondiente por lo menos durante 5 minutos. Otra medida a observar es ventilar completamente el área de trabajo al comenzar un nuevo día, antes de encender cualquier conmutador eléctrico (incluso el de la luz). Con estas medidas se evitan riesgos de explosiones.

11.3.1.1. Especificaciones de los gases cromatográficos

Aunque para muchos fines analíticos y tecnológicos los gases mencionados, producidos industrialmente, poseen un grado de pureza suficiente, en el caso de la cromatografía se requiere que ellos satisfagan determinadas especificaciones, que de no cumplirlas los harían inservibles. En la tabla 11.1 se resumen las características de los gases para uso cromatográfico**.**

Tabla 11.1.

Gases usados en cromatografía

Gas	Denominación	Impurezas máximas	Usos
H_2	Purísimo	O_2 < 300 ppm H_2O < 80 ppm	Ionización por llama
H_2	Especial purificado	< 5 ppm de O_2 < 5 ppm de CO_2	Conductividad térmica
Helio	99.995	Trazas de CO_2, H_2, CH_4 y Ar	Uso general como gas portador
Argón	99.95	< 100 ppm de O_2 trazas de N_2	Uso como portador
Nitrógeno	seco certificado	< 2000 ppm de Ar < 10 ppm de H_2O < 5 ppm de O_2	Uso general como gas Portador
Aire	seco		Ionización por llama

11.3.2. Prefiltros.

Las impurezas que normalmente acompañan a los gases portadores, las cuales no pueden ser eliminadas en los procesos de obtención, afectan en mayor o menor grado los resultados cromatográficos. En la mayoría de los casos, la presencia de impurezas se refleja en inestabilidad de la línea de base y sobre todo ruido de fondo. En el caso de detectores sensibles como el de captura electrónica, tanto el agua como el oxígeno disminuyen gradualmente su sensibilidad hasta reducirla a cero.

Cuando se trabaja a temperatura programada con isoterma inicial baja, la columna capta impurezas, que luego se eluyen cuando se eleva la temperatura. Los cromatogramas resultantes son difíciles de interpretar.

Hay sin embargo un efecto de las impurezas que no se observa a corto plazo, a no ser que estén en concentraciones muy grandes. Ese efecto es el deterioro gradual de la fase estacionaria, en especial cuando la impureza es oxígeno y se trabaja a temperaturas altas.

Para evitar el efecto adverso de las impurezas, la mayoría de los equipos están dotados de filtros purificadores de gases. Estos filtros, situados inmediatamente a la entrada del cromatógrafo, están cargados con tamices moleculares, los cuales retienen agua, grasa, etc. Estos tamices moleculares deben reactivarse periódicamente, de ser posible cada vez que se cambia un balón.

Los filtros purificadores son de tres tipos:

- *De gel de sílice*. Para eliminar la humedad. Por lo general tienen indicador que permite saber cuándo es necesario cambiarlos.

- *De tamices moleculares*. Estos retienen impurezas orgánicas incluidos hidrocarburos provenientes de los compresores usados en la obtención de los gases portadores.
- *Trampas de oxígeno*. Por lo general regenerables, que eliminan trazas de este gas. Este tipo de filtro es indispensable cuando se trabaja con detectores de captura electrónica.

11.3.3. Control de flujo. Manoreductor

Es preciso reducir la presión elevada del gas contenido en el balón antes de que llegue al cromatógrafo. Para ello se hace uso de un manoreductor el cual garantiza que la presión que entra al cromatógrafo no sea superior a 5 *kg/cm²*. Esto es importante ya que dentro del equipo se encuentran situados reguladores de caudal e indicadores de presión que no soportan grandes presiones. En la mayoría de los equipos los indicadores de presión a la entrada de la columna no sobrepasan los 3 *kg/cm²*. En otros, aparte de los indicadores de presión tienen medidores de flujo (rotámetros) a la entrada de la columna. Los medidores de flujo pueden también estar situados a la salida de la columna. Cuando se usa generadores de Hidrógeno o Nitrógeno estos equipos entregan esos gases con presiones en los rangos requeridos para el trabajo cromatográfico.

11.3.4. La cámara de inyección

Inmediatamente a continuación del indicador de presión (o caudal) del gas portador, se encuentra situada la parte del cromatógrafo conocida como cámara de inyección. Este es el lugar por donde se introduce las muestras. La figura 11.2 muestra un esquema de una cámara de inyección típica.

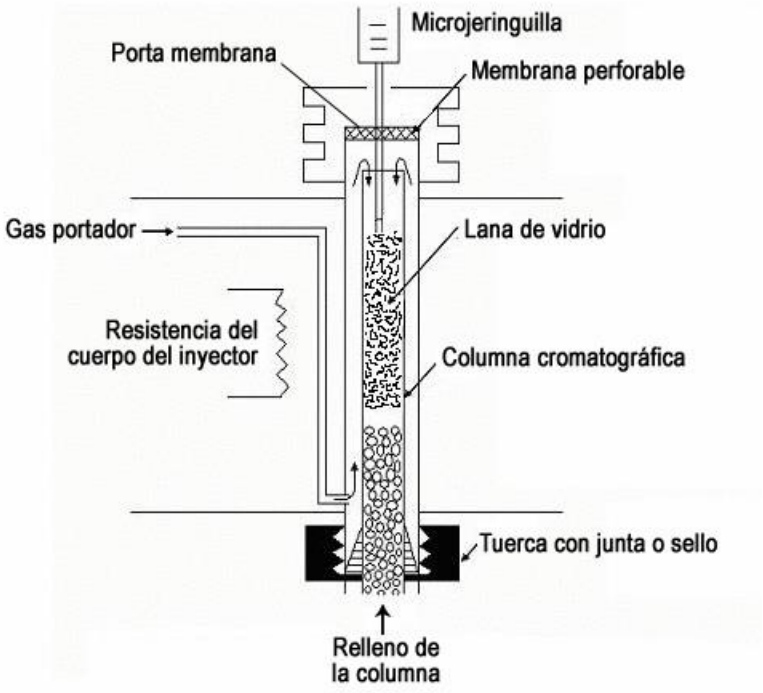


Figura 11.2. Cámara de inyección clásica

El gas portador, calentado antes de entrar a la cámara, arrastra consigo los vapores de la muestra, la cual se introduce a través de la membrana perforable de goma de silicona, haciéndolos entrar y avanzar a través de la columna cromatográfica.

El diseño de la cámara de inyección permite que las muestras que se introducen en ella, a través de la membrana o septum, se vaporicen rápida y totalmente. La temperatura y capacidad calorífica de la cámara, facilitan el paso al estado de vapor.

El material, la forma y el tamaño del portamembranas garantizan una radiación considerable de calor, evitando el deterioro de la membrana perforable.

De la cámara de inyección depende en gran medida el resultado de análisis cromatográfico e incluso si este se puede realizar o no.

Se recordará que solo se puede analizar por cromatografía gaseosa aquellos compuestos que de por sí o mediante algún procedimiento físico, químico o físico-químico, pasan al estado de vapor o adquieren una presión de vapor tal bajo las condiciones de operación, que le permita avanzar a través de la columna. El fenómeno que tiene lugar en la cámara de inyección es precisamente de naturaleza física (vaporización). Los otros procedimientos (químicos, químico-físicos) son realizados por el analista sobre una muestra dada para aumentar su volatilidad. Se describirán más adelante.

La importancia de la cámara de inyección es enorme. Si la muestra que se introduce en ella no se volatiliza de inmediato o lo hace incompletamente, la masa de vapor llega a la columna en forma de una banda ancha con una densidad baja de vapor. Si la temperatura es demasiado alta, la muestra pasa muy rápidamente al estado de vapor, entrando a la columna en forma de banda estrecha y concentrada. Sin embargo, se corre el riesgo que parte de la muestra se pirrolice.

La muestra que se inyecta a una temperatura insuficiente presenta una banda de vapor ancha, la cual**,** al entrar en la columna abarca más de un plato teórico. En casos extremos no hay respuesta del detector o se presenta una ondulación simple de la línea de base en la región correspondiente al tiempo de retención del analito.

Cuando la temperatura es adecuada, la banda de vapor ocupa la altura equivalente a un plato teórico.

En resumen cabe destacar lo siguiente:

- En el análisis por cromatografía de gases son críticos los pasos de: inyección con una microjeringa, evaporación instantánea de las muestras líquidas en la cámara del inyector, y el transporte a la columna
- La temperatura del inyector debe ser mayor que la de la columna, para producir la volatilización inmediata de la muestra, después de su inyección.

Hay que cuidar que no sea excesiva para evitar la descomposición o la isomerización de sus constituyentes.

- Aunque la microjeringa usada permita medir volúmenes menores, si la muestra se introduce a un inyector caliente, es imposible inyectar algún volumen menor que el de capacidad interna de la aguja.
- En la mayoría de las muestras, el factor determinante del proceso de evaporación es el solvente (no el soluto). Por ser el componente mayoritario y en especial si posee capacidad calorífica grande, puede consumir el 99 % de de la energía térmica.

Hay una diferencia notable entre la cámara de inyección y la forma en que se introduce la muestra en el sistema cromatográfico cuando se usan columnas empacadas, respecto al inyector y el procedimiento en el caso de las columnas capilares.

A continuación se expondrán las principales características de estas cámaras en función del tipo de columna empleada.

11.3.4.1. La cámara de inyección para columnas empacadas

Como regla general la temperatura de la cámara de inyección debe situarse entre 10^{o}C y 20^{o}C por encima de la temperatura a la cual se opere la columna cromatográfica. En el caso de cromatografiarse mezclas, debe siempre ajustarse dicha temperatura por lo menos al valor correspondiente al punto de ebullición del componente menos volátil.

Ocurre en la práctica que mejora el aspecto de un pico cuando en lugar de cromatografiarlo a la temperatura de cámara indicada, se hace a una superior. Esto puede ser un fenómeno transitorio ya que, con mucha frecuencia, una temperatura superior a la recomendada produce pirrólisis y carbonización en la cámara, lo cual provoca más tarde destrucción de las sustancias inyectadas o adsorción.

Otro requerimiento importante de esta parte del cromatógrafo es que sus dimensiones y formas sean tales que garanticen una buena mezcla vapor – gas portador, con un tiempo mínimo de transporte hasta las primeras capas del relleno de la columna, reduciendo con ello la difusión en la fase gaseosa. En realidad el tiempo de transporte depende del volumen de la cámara de inyección (llamado volumen muerto del inyector) y ya viene reducido a un mínimo por el fabricante del equipo. Sin embargo se puede favorecer el transporte rápido hacia la columna elevando ligeramente la temperatura del inyector.

Inyección en la columna

Un método muy difundido actualmente es la inyección en la columna. En el la muestra se introduce mediante una microjeringuilla a unos pocos *mm* de distancia del relleno de la columna. Prácticamente la volatilización, tanto del soluto como del solvente, ocurre en las primeras capas del relleno. Con ello se

minimiza el volumen muerto. Con frecuencia se sitúa un taponcito de lana de vidrio desactivada a la entrada de la columna, sobre el relleno. Este tiene la doble función de favorecer la evaporación y el mezclado de la muestra con el gas portador.

En el método de inyección en la columna se introduce la muestra con una microjeringuilla de aguja larga de modo que esta llegue al relleno o más frecuentemente, se sube el nivel de este en la columna (Ver Fig. 3.25) lo cual presenta desventaja. Al estar la fase líquida del relleno en la zona del cuerpo del inyector expuesta a una temperatura superior a la de la columna, esta se volatiliza y se condensa más adelante, si no es que llega al detector provocando ruido de fondo. Con el transcurso del tiempo, el relleno de la entrada de la columna se queda sin fase líquida y presenta fenómenos de adsorción de solutos. En la práctica esto tiene una solución sencilla. Se desconecta la columna del cromatógrafo y se extrae el relleno de su entrada en una longitud de unos 10 *cm* – 15 *cm*, sustituyéndose por relleno nuevo de la misma composición.

Volumen de muestra a inyectar

Para cada equipo y tipo de muestra (gaseosa o en solución) hay un volumen de inyección que no debe sobrepasarse ya que esto produciría aumento en los t'_r así como ensanchamiento de las bandas de los solutos.

Como regla general, en columnas de relleno se puede inyectar entre 0,5 – 10 μL de muestras en solución y de 1– 10 mL cuando las muestras son gaseosas, mientras que las columnas capilares admiten volúmenes muchos menores. Para líquidos no se debe sobrepasar de 1 μL.

Errores de la inyección

Como en toda operación analítica, la inyección en cromatografía gaseosa está afectada por dos tipos principales de errores: error de método y error de manipulación. El error de manipulación está asociado a la falta de repetibilidad, fundamentalmente del tiempo en que se realiza la inyección de la muestra. El tiempo de inyección de la muestra influye sobre la altura del pico y su tiempo de retención. Cuando los picos tienen un tr grande, las variaciones en el tiempo de inyección carecen de importancia pero hay que ser muy cuidadoso en el caso de picos con tr pequeños, especialmente en análisis cualitativo, ya que las variaciones entre una inyección y otra pueden en muchos casos producir dudas respecto a la identidad de un compuesto.

El error de método está asociado al volumen de la muestra a inyectar. En este sentido, el error disminuye exponencialmente en la medida que se inyectan volúmenes mayores de muestra hasta 5 μL. Sin embargo, cuando la eficiencia de la columna no sea limitante, es factible inyectar volúmenes mayores.

Métodos de inyección

Muestras líquidas: El error resultante en la inyección de muestras líquidas depende en parte del método que se siga. En trabajos donde no se requiera una exactitud grande, puede aceptarse como el volumen inyectado el valor de enrase de la microjeringuilla. Los volúmenes entregados son en realidad mucho mayores a los nominales. Esto se debe a que parte del líquido contenido en la aguja es expulsado por efecto del calor de la cámara. Con esta forma de proceder, el error relativo disminuye con el volumen de la muestra inyectada.

Muestras gaseosas: Para introducir muestras gaseosas se usan jeringuillas hipodérmicas convencionales o un tipo especial de jeringuilla fabricado con la finalidad cromatográfica. Estas últimas son muchos mejores, ya que las fugas de muestra son mínimas, a pesar de que como sabemos, la presión que se genera en la cámara de inyección es grande.

Muestras sólidas: La introducción de muestras sólidas es mucho más compleja que las líquidas o gaseosas. Se requiere normalmente cámaras con aditamentos especiales que permitan la introducción de cápsulas pequeñas de vidrio o Indium, las cuales contienen la muestra sólida. Las cápsulas de vidrio se fragmentan mecánicamente, mientras que las de Indium se funden (a 156 ^{o}C), liberando la muestra en ambos casos.

11.3.4.2. El inyector y los métodos de inyección para columnas capilares

Dada las características de las columnas capilares y semicapilares (wide bore) que serán explicadas en epígrafes próximos, tanto el inyector como los métodos de inyección varían sustancialmente con respecto a la parte del cromatógrafo ya explicada.

En efecto, las columnas capilares tienen un diámetro interno muy pequeño, lo que limita al volumen de inyección a 1μL o menos. Además, la cantidad de fase estacionaria en la columna y más importante, el espesor de la película, es muy pequeño. Esto necesariamente limita el tamaño de muestra a inyectar y el volumen en que esta se disuelve. Es por eso que la inyección en cromatografía capilar, es lo que más influye en la precisión de los resultados analíticos obtenidos con esa técnica.

Se ha desarrollado varios modos de inyección con vistas a minimizar o evitar los errores que se introducen durante esa operación cromatográfica. Entre ellos, los más usados son: a) el método Split, b) el método Splittless, c) la inyección en columna fría y d) la inyección mediante el dispositivo PTV (vaporizador con temperatura programada), entre otros.

a) Inyección Split

En el modo de inyección split solo una fracción del volumen inyectado se introduce en la columna cromatográfica, el resto se desvía hacia el exterior. El analista predetermina que volumen desea que se introduzca en la columna

(acorde a sus condiciones cromatográficas especialmente las características de la columna)

En los equipos modernos esto se controla automáticamente, a través del mando electrónico del cromatógrafo, haciendo uso de un inyector modificado conocido como splitter, cuya función es precisamente facilitar la división del caudal inyectado.

Un esquema simplificado de un splitter se muestra en la figura 11.3.

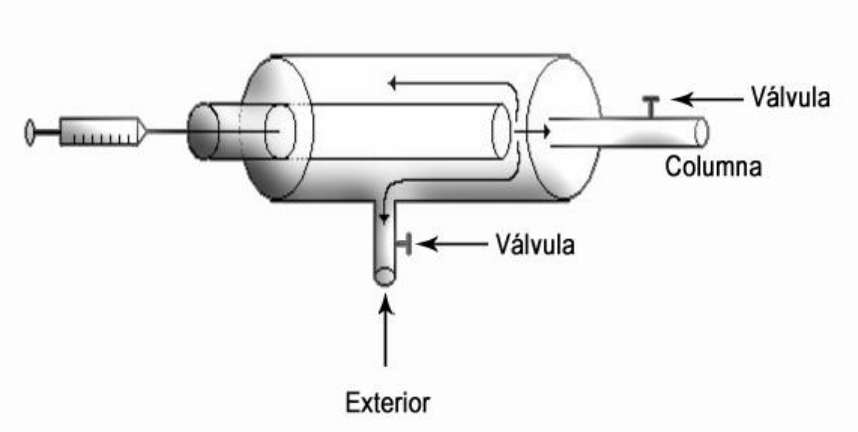


Figura 11.3. Esquema simplificado de un inyector Split

Un volumen "normal" de muestras de V μL se introduce en el inyector split. Dada la relación previamente establecida por el analista (relación split), se logra la entrada a la columna del volumen deseado de muestra. Así, sí la relación split es por ejemplo 10/1, solamente el 10 % de la inyección entra a la columna mientras que el 90 % se elimina o va al exterior.

Este método de inyección es muy usado en la actualidad y posee sin dudas ventajas, entre ellas:

- Es simple de operar.
- Se inyecta con microjeringuilla convencional.
- Por lo general puede usarse cualquier solvente para disolver la muestra.
- Hay poca perturbación por ensanchamiento de las bandas cromatográficas, debido a transferencia lenta del inyector a la columna.

Se le señala sin embargo dos desventajas fundamentales:

1. *Poca repetibilidad de las inyecciones:* La falta de repetibilidad (error de inyección) se pone de manifiesto sobre todo cuando se trabaja con programación de temperatura y la isoterma inicial está por debajo de la temperatura de ebullición del solvente usado para disolver la muestra. Se debe a que la relación split prefijada (relación del flujo de gas portador que llega al inyector respecto al que entra a la columna) no siempre es igual a la relación split verdadera (fracción de la muestra que llega a la columna).

De hecho, en la práctica la relación split prefijada es menor que el valor split verdadero, debido a que entra más muestra que la correspondiente. Por eso no es posible calcular la cantidad de muestra inyectada basado simplemente en la relación split. Tampoco se reproduce adecuadamente la inyección. Debe señalarse que esta deficiencia puede resolverse usando un patrón interno.

Para garantizar una exactitud adicional en las determinaciones cuantitativas, es preciso mantener constante la relación split y la temperatura de la columna, así como disolver la muestra y el patrón (en caso de usar patrón externo), en el mismo solvente

2. *Efecto discriminante de solutos:* Los solutos de pesos moleculares diferentes tienen por lo general volatilidades distintas, por lo que no se comportan del mismo modo cuando se inyectan juntos mediante el método split. En general, en este dispositivo hay zonas más calientes que otras. En las zonas menos calientes, incluida la punta de la jeringuilla, se produce una condensación parcial de los analitos menos volátiles de una mezcla dada. Además y puesto que el tránsito hacia la entrada de la columna es muy rápido, no se alcanza una distribución homogénea de estos en el vapor que se produce en el inyector. Por ello la proporción que entra a la columna es menor que la de los analitos más volátiles, produciéndose el fenómeno llamado discriminación

b) Método de inyección Splitless

En este procedimiento de inyección la totalidad de la muestra que se introduce en el inyector accede a la columna. Por esta razón el volumen máximo de muestra a inyectar debe ser muy pequeño. Por lo general nunca excede a un 1 μL y aún con volúmenes inferiores al indicado, se origina zonas de vapor condensado en los primeros 20 *cm-60 cm* a la entrada de la columna, cuando se trabaja con isotermas iniciales relativamente bajas (del orden del punto de ebullición del solvente o por debajo de este)

Además de este inconveniente y para garantizar una exactitud satisfactoria, debe inyectarse con microjeringuillas de 1 μL*,* las cuales tienen tendencia a tupirse con facilidad.

c) Inyección en columna fría

Esta es una variante del método de inyección splitless, pero con la característica que no utiliza un cuerpo de inyector sofisticado. Además, en este caso, la punta de la microjeringuilla se introduce directamente en la columna cromatográfica, para lo cual se requiere expansionar esta ligeramente.

La temperatura de la columna debe encontrarse en el rango de 40*ºC* a 50*ºC*. Después que se introduce la muestra, se retira la microjeringuilla y se programa de inmediato la temperatura del horno (entre 30*ºC/min* a 40*ºC/min*), hasta alcanzar la temperatura de operación.

Con este método se puede inyectar de 1 *μL* a 1,5 *μL* de muestra, con resultados satisfactorios en lo que respecta a exactitud y ausencia de

discriminación.

El método sin embargo tiene algunas características que es preciso tener en cuenta a la hora de seleccionarlo:

- Se requiere expansionar la punta de la columna.
- Es preciso usar microjeringuillas con agujas muy finas. Esto tiene el inconveniente que se inutilizan fácilmente (se tupen, se doblan)
- Con este método no es posible automatizar la inyección.
- Residuos no volátiles de la inyección tienden a acumularse en el extremo de la columna por donde se introduce la aguja, con efectos nocivos (catalíticos, de absorción) a largo plazo.

Se señala además que la reproducibilidad de los primeros picos no es buena, debido a que la inyección en la columna fría produce una zona inundada con la solución de la muestra inyectada, que puede llegar hasta 60 *cm* de longitud (en dependencia del volumen inyectado). Esta masa liquida se mueve rápidamente impulsada por el gas portador, se expande dentro de la columna hasta alcanzar una monocapa, comenzando a pasar a la fase de vapor. En resumen, la muestra entra a la columna cromatográfica para iniciar la separación como una banda ancha, por lo que los picos resultantes serán también anchos.

Este fenómeno es mayor en columnas de menos de 25 *m*. En columnas mayores el efecto es menor pero se presenta siempre, especialmente cuando la muestra se inyecta en solvente polar.

d) Inyección con programación de temperatura del vaporizador

Este modo de inyección utiliza un inyector clásico modificado ingeniosamente. La muestra se introduce manual o automáticamente en una cámara, que se encuentra a temperatura ambiental. Al inyectar la muestra en frío, no hay perdidas ni discriminación. Después que se saca la aguja se programa la vaporización hasta el valor máximo preestablecido, a partir del cual comienza el programa de calentamiento del horno, la apertura de la válvula del inyector hacia la columna y el enfriamiento posterior de la cámara de inyección.

Con adaptadores apropiados, este inyector admite columnas desde 0,22 *mm* hasta 1,2 *mm* de diámetro externo.

11.3.5. La columna cromatográfica

La columna se encuentra acoplada a la salida de la cámara de vaporización por un extremo y por el otro a la entrada del cuerpo del detector. El acoplamiento de la columna depende del tipo de ésta y del fabricante del equipo.

Las columnas de vidrio se acoplan mediante tuercas. La hermeticidad del acoplamiento lo garantizan sellos de teflón u otro elastómero termorresistente.

En caso de operación a temperatura elevada, el sello usado es de grafito (límite de operación hasta 500 *ºC*).

De la columna cromatográfica depende el éxito del análisis. Es la parte más importante del cromatógrafo, de cuya eficiencia y características resulta si una mezcla se puede separar o no, si un compuesto puede o no cromatografiarse. Se expondrá en detalle a continuación los elementos que entran a formar parte del término columna cromatográfica.

Las columnas cromatográficas para cromatografía de gases son tubos de longitud y diámetros apropiados de vidrio, acero inoxidable, aleaciones metálicas, cobre, plástico, etc. El material de construcción se selecciona de acuerdo a las características de los problemas a resolver. Sin embargo, debido a sus escasas propiedades catalíticas, el vidrio es el material que más se ha usado en la construcción de columnas, desde las simples en forma de U hasta las capilares, las cuales alcanzan en algunos casos más de 100 *m* de largo. Con el avance de la tecnología, se fabrican hoy columnas de sílice que compiten favorablemente con las de vidrio.

Atendiendo a su función, las columnas pueden clasificarse en analíticas y preparativas. La finalidad de las primeras es la separación de un compuesto de otros para identificarlo y cuantificarlo, mientras que las columnas preparativas se utilizan en la obtención de fracciones puras.

Ahora bien, si la clasificación se basa en la forma en que está dispuesta la fase estacionaria en las columnas, éstas pueden ser: *columnas de relleno o empacadas*, si la fase estacionaria recubre a un soporte inerte, más o menos regular, el cual llena totalmente el interior de la columna y *columnas capilares*, cuando las paredes interiores de un tubo muy fino sirven de soporte a la fase estacionaria (figura 11.4).

11.3.5.1. Columnas empacadas

Las columnas de relleno o empacadas son aquellas en las que la fase estacionaria recubre a un soporte inerte, más o menos regular, el cual llena totalmente el interior de la columna

Las dimensiones de una columna empacada se escogen de acuerdo a las características del problema analítico a resolver. Por lo general cuanto mayor es la longitud de una columna, mejor será su poder separativo. El límite práctico de longitud está determinado por la caída de presión del gas portador dentro de la columna. El diámetro interno es también importante pues un aumento del diámetro interno se traduce en picos anchos. Las columnas de pequeño diámetro interno además de su eficiencia, son muy buenas en trabajos de programación de temperatura, puesto que se establece muy rápidamente el equilibrio térmico entre el horno y el relleno cromatográfico.

Las columnas de relleno tienen por lo general una longitud entre 0.3 y 10 metros y diámetros internos entre 2 y 6 mm. Debido a la gran longitud de algunas columnas es preciso enrollarlas.

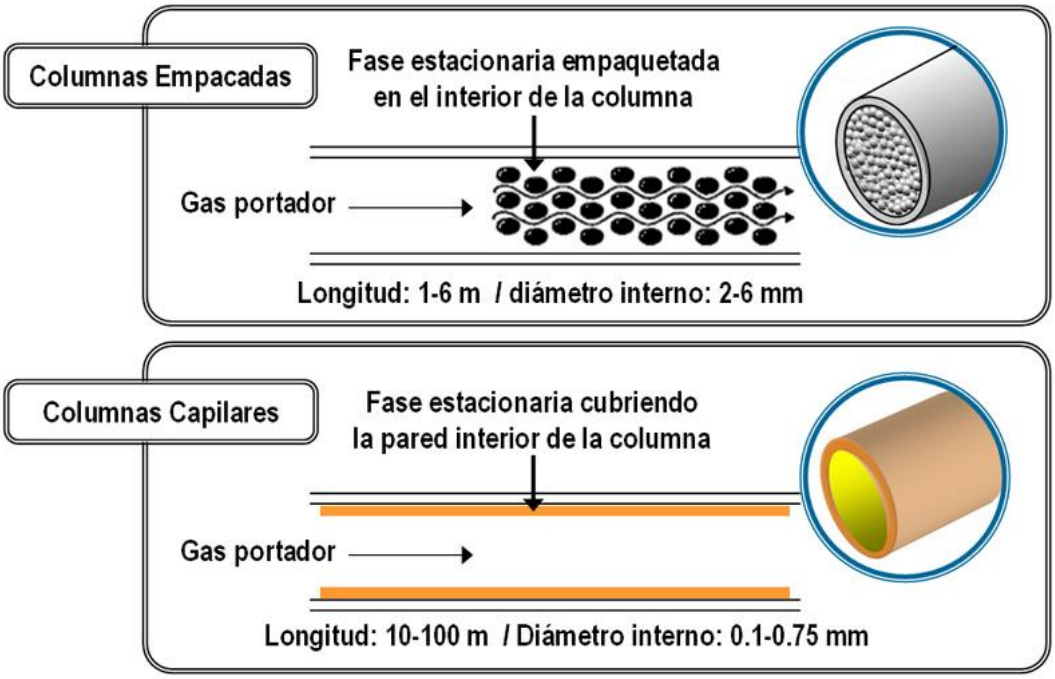


Figura 11.4. Columnas para cromatografía de gases

11.3.5.1.1. El soporte de relleno de la columna

Las columnas se rellenan con un sólido o soporte granular más o menos inerte, recubierto de una fase estacionaria líquida a la temperatura de operación del cromatógrafo. La fase estacionaria es la que le confiere a la columna sus características separativas.

Sirve como soporte cualquier material granular inerte, con una superficie especifica menor de 10 m^2/g, de modo que la película liquida que lo recubra ofrezca un buen contacto con el analito (o sea, un rápido intercambio líquido-gas). Debe ser además duro y termoestable, con una porosidad tal que favorezca el paso del gas portador. En realidad son pocos los materiales, por no decir ninguno, que satisfacen estos requisitos. Se fabrican sin embargo productos cuyas características permiten su uso como soporte.

Los soportes de gran uso en cromatografía gaseosa pueden ser clasificados en dos grandes grupos; Diatomáceos y No Diatomáceos. Los Soportes Diatomáceos usan para su fabricación la diatomita, también llamada tierra de infusorios o Kieselguhr. Este material está formado por los esqueletos fósiles de algas unicelulares, las diatomeas, las cuales se han acumulado en grandes cantidades en los mares y lagos de algunas regiones del mundo. La característica

sobresaliente de estas algas fósiles es la de tener un esqueleto poroso. El diámetro medio de los poros es del orden de 1 micrómetro poco más o menos.

Los soportes no diatomáceos han encontrado algún uso por sus características particulares y están llamados a ocupar un lugar destacado dentro de la cromatografía gaseosa. Entre ellos se encuentra: el teflón, las bolas de vidrio y los polímeros orgánicos. El Teflón es un soporte muy inerte, especial para cromatografiar agua, alcoholes, aminas, amoniaco, SH_2 y SO_2. La eficiencia de las columnas rellenas con teflón es baja por la poca uniformidad del recubrimiento de este soporte. Por encima de 290 *ºC* no puede usarse ya que emite vapores tóxicos.

Las micro bolas de vidrio son muy uniformes en tamaño (ideales*)* pero presentan desventajas grandes. En primer lugar su superficie es muy pequeña y por tanto retienen poco la fase estacionaria; son sólidos no porosos y además la fase liquida se acumula en los espacios libres dejados entre las bolas, con espesores mucho mayores a los de la película que recubre a éstas.

Las microbolas poliméricas presentan buenas características. El tamaño es muy uniforme, son porosas y algunas no requieren fase líquida.

En la tabla 11.2 se presenta algunos de los soportes de gran uso cromatográfico.

Tabla 11.2.

Soportes de uso cromatográfico

Característica	**Soportes Diatomáceos**		**Soportes no Diatomáceos**		
	Blanco	**Rosado**	**Teflón**	**Micro bolas de vidrio**	**Micro bolas orgánicas**
Actividad superficial		Alta	Despreciable	Despreciable	Despreciable
Uniformidad de partículas	No	No	No	Buena	Buena
Ancho de poro	3-10 micrómetros	1 micrómetro	-	No	-
Superficie específica	1 m^2/g	4 m^2/g	-	-	-
Reacción	Básica	Ácida	No	No	-
Ejemplo de soporte	Chromosorb W Chromosorb G Gas Chrom Q Celite 545	Chromosorb P	Kel-F	-	Porapak Chromosorb 102

11.3.5.1.2. La fase estacionaria en las columnas empacadas

La fase estacionarla, líquida a la temperatura a la que se realiza el análisis cromatográfico, tiene una importancia extraordinaria. Ella recubre un soporte más o menos inerte, en forma de película fina y constituye la parte activa del relleno. Entre ella y el gas portador se realiza el proceso de partición, base de la cromatografía gas-líquido.

La importancia que ha adquirido reciente la cromatografía gaseosa se debe a que se ha podido disponer de una fase estacionaria adecuada para cada problema analítico particular. Actualmente son adquiribles comercialmente fases estacionarias cuyas propiedades físico-químicas varían dentro de un rango muy amplio: utilizables desde temperatura ambiente o por debajo de ésta, hasta fases estacionarias cuyo máximo de operación supera los 500 ^{o}C; desde escasa o nula polaridad hasta polaridades elevadas, disponiéndose en algunos casos de fases estacionarias químico-específicas para resolver problemas analíticos particulares.

La fase estacionaria requiere tener una serie de características. Las fundamentales son las siguientes:

- Debe ser selectiva a los componentes de la mezcla que se desea separar. Esto quiere decir que sea capaz de disolver bien el (los) analito (s) para dar lugar a la separación de bandas cromatográficas. Si la solubilidad de los analitos en la fase estacionaria es pequeña, habrá mala resolución, excepto si los analitos a separar difieren considerablemente en sus puntos de ebullición.
- La fase estacionaria debe ser líquida a la temperatura de operación, con viscosidad baja y una tensión de vapor pequeña. Las pérdidas de fase estacionaria por evaporación y arrastre deben ser moderadas, no debiendo causar su presencia en el detector ruido de fondo que altere la sensibilidad del método.
- Debe ser estable a la temperatura de operación y no reaccionar con los analitos a separar.
- Debe mojar bien el soporte, formando una película uniforme, lo cual no depende solamente de la fase líquida, sino también del soporte empleado. La falta de uniformidad de la película de FE se presenta en soportes de microbolas de vidrio y también en soportes con superficie rugosa. En los soportes diatomáceos la fase estacionaria tiene un espesor mayor en sus poros y canales.

El éxito de una separación por cromatografía gaseosa en columnas de relleno depende de varios factores, entre los que pueden citarse como más importantes: A. la temperatura de uso de la fase estacionaria, B. la polaridad de la fase estacionaria, C. la interacción fase estacionaria – soluto, D. la presión de vapor de los analitos y E. la relación fase estacionaria – soporte.

A. Temperatura de uso de la fase estacionaria

Aunque en principio no se usa la fase estacionaria a una temperatura por debajo de su punto de fusión, en la práctica, el simple hecho de que ésta sea líquida a una temperatura dada no implica necesariamente que se pueda usar. Es preciso considerar la viscosidad de la fase líquida, especialmente cuando el espesor de la película sea grande, ya que puede afectarse considerablemente la eficiencia de la columna. En la práctica es posible trabajar una fase estacionaria a una temperatura para la cual su viscosidad sea de 1 poise o algo menor. En caso de películas delgadas de fase líquida se admiten viscosidades mayores y para películas gruesas todo lo contrario.

En relación con la temperatura máxima a la cual se trabaja una FE, esta debe estar lo suficientemente alejada de su punto de ebullición de modo que su tensión de vapor no influya en la respuesta del detector. El límite práctico máximo de operación se encuentra entre 200 *ºC* y 250 *ºC* por debajo del punto de ebullición de la FE.

En la práctica el analista se siente tentado de trabajar a temperaturas altas ya que con ello se aumenta las solubilidades de los analitos en la FE, los picos tienden a ser más estrechos puesto que la viscosidad es menor, los tr también son menores (siempre que se mantenga constante el flujo de gas portador). Pero contrarrestando esas ventajas hay desventajas a largo y a corto plazo.

Una desventaja a largo plazo la tenemos en la duración de la columna. Esta, debido a la volatilización y arrastre de la FE, durará tanto menos cuanto más se use cerca del límite máximo de temperatura de operación.

La principal desventaja a corto plazo, de operar a temperatura elevada la tenemos en la presencia perturbadora de los vapores de FE en el detector y en muchos casos el ruido disminuye la calidad y sensibilidad de detección.

B. Polaridad de la fase estacionaria

El conocimiento de la polaridad de las fases estacionarias disponibles comercialmente es de mucha utilidad práctica. El analista puede hacer una elección correcta de una FE ante un problema concreto a resolver, o sacar conclusiones acertadas acerca de la polaridad de los componentes de una muestra, si conoce las características de la muestra con que trabaja. En ocasiones es suficiente, para hacerle frente a los problemas que se presentan a diario, disponer de una escala cualitativa de polaridades de las fases estacionarias. Por lo general esa escala toma valores de 0 a 5. A las fases no polares se les asigna el valor 0 mientras que a las de máxima polaridad le corresponde el 5.

C. Interacción fase estacionaria-soluto.

La interacción FE - analito depende de la naturaleza de ambos. Esta interacción será mayor cuanto más similares sean las propiedades del analito y de la FE Así por ejemplo, si un analito A difiere notablemente en propiedades físico-químicas

de una FE dada, su solubilidad en ésta será escasa. Este analito permanecerá poco tiempo en la fase estacionaria (por la falta de afinidad hacia ella) por lo que el vapor se eluirá rápidamente. Su tr será pequeño. Por el contrario, si otro analito B tiene propiedades en común con la FE, entonces su solubilidad en esta será considerable, su permanencia en la columna será grande (ya que el analito solo avanza a través de la columna cuando se encuentra en la fase gaseosa) y por tanto su tr será mucho mayor que el del analito A.

Se sabe que los analitos polares se cromatografían bien en FE polares, mientras que los analitos apolares lo hacen bien en FE apolares.

Debido a la poca afinidad entre un analito polar y una FE apolar, su tiempo de retención en ésta será menor que el de un analito apolar de igual punto de ebullición. De modo análogo, un analito apolar tendrá un tr menor en una FE polar que el de un analito polar de igual punto de ebullición.

Así mismo, los tr de distintos analitos polares de iguales puntos de ebullición serán proporcionales a sus polaridades respectivas, esto es, mientras mayor sea la polaridad de un analito, mayor será su tr en igualdad del resto de las condiciones. Finalmente, el orden de elución de los analitos apolares en FE apolar, está regido por sus puntos de ebullición; los más volátiles tienen menores tr que los menos volátiles.

Estas reglas cualitativas nos sirven para elegir una FE si se conoce la polaridad de los componentes de una muestra. Inversamente, conocida la polaridad relativa de una FE, es posible sacar conclusiones cualitativas acerca de la naturaleza de los componentes de una mezcla separada por cromatografía gaseosa, determinados sus tr respectivos.

D. Presión de vapor de los analitos.

Consideremos ahora la influencia de la presión de vapor sobre el tr. Para dos analitos *A* y *B* en equilibrio con una FE a una temperatura T de operación del análisis (en la cual la FE es líquida y los analitos A y B estarán disueltos en ella), para una misma fracción molar el compuesto que exhiba una presión de vapor mayor tendrá una proporción mayor de sus moléculas en la fase gaseosa y consecuentemente su tr será menor que el correspondiente al compuesto que tenga una menor presión de vapor.

E. Relación fase estacionaria - soporte

La influencia sobre el tr, el tamaño de la muestra, la eficiencia y la vida útil de la columna están determinadas por la proporción de FE que recubre el soporte.

Después de la naturaleza de la FE, es la proporción de ésta en el relleno la que decide la eficiencia y durabilidad de una columna. A medida que va siendo mayor la cantidad de FE que recubre un cierto soporte, será mayor el espesor de la película que recubra las partículas de éste. El aumento del espesor de la película va acompañado de un aumento del tiempo de retención de los analitos, en

igualdad del resto de los parámetros, lo que puede conducir a una disminución de la eficiencia de la columna (crece h).

11.3.5.1.3. Vida útil de la columna. Envejecimiento

La vida útil de una columna es muy variable, desde algunos días hasta un año o más. Una columna durará más mientras se trabaje a una temperatura lo más alejada posible del máximo señalado para la FE en cuestión. De esta forma tanto la volatilización como la descomposición de la FE serán mínimas, obteniéndose resultados satisfactorios durante un periodo largo de tiempo. Todo lo contrario ocurre cuando se trabaja muy cerca o por encima del valor máximo de la temperatura de operación de la FE.

Otros factores que también influyen en la vida de la columna son:

- Calentar la columna sin antes haber desalojado el aire del sistema mediante el gas portador (sobre todo cuando se cambia o instala columnas nuevas).
- Trabajar con gases portadores puros. Si los gases portadores contienen impurezas (por ejemplo oxígeno) por encima de las indicadas la vida de la columna se reduce considerablemente. En algunos casos pierde su efectividad en unas pocas horas.

El proceso de pérdida gradual de la eficiencia de una columna cromatográfica se conoce como envejecimiento. En condiciones normales es causado por la volatilización de la FE y por fenómenos de cristalización de esta entre los períodos de utilización y almacenaje.

11.3.5.2. Columnas capilares

El uso amplio que han tenido las columnas capilares desde su introducción en la cromatografía gaseosa hasta nuestros días y las perspectivas que se vislumbran, se debe sin duda a los resultados sobresalientes alcanzables con éstas, especialmente en resolución y reproducibilidad. Esto se ha puesto aun más de manifiesto con el uso de la sílice fundida como material de partida para la fabricación de columnas, aprovechando de forma acertada la tecnología de fabricación de las fibras ópticas. Esto ha permitido a la cromatografía gaseosa capilar, conocida también por sus siglas HRGC (Cromatografía Gaseosa de Alta Resolución), estar vigente hasta nuestros días a pesar del auge y la pujanza de la HPLC.

11.3.5.2.1. Aspectos generales de las columnas capilares

Las columnas capilares son aquellas formadas por un capilar de diámetro interno muy pequeño, en cuyas paredes interiores está dispuesta la fase estacionaria

El material constitutivo de las columnas capilares fue en sus comienzos el vidrio, tanto el llamado vidrio soda (blando) como el vidrio duro Tipo Pyrex ó Durán. En la actualidad sin embargo, la mayoría de las columnas se fabrican industrialmente usando sílice purísima como material de partida. No obstante debido a las características del material de partida y del producto final, las

columnas de vidrio encuentran aún uso analítico. Así, como se tratará más adelante, las columnas de vidrio requieren un tratamiento físico y químico muy complejo de su pared interior. Ello permite usar un número muy grande de fases estacionarias para su recubrimiento y en dependencia de su naturaleza, es posible trabajar con ellas a temperaturas por encima de los 400 *ºC,* lo cual está vedado para las columnas de sílice fundida, que tienen como temperatura límite 300 *ºC* (debido a que el recubrimiento exterior de poliimida, usado para aumentar su flexibilidad, se descompone alrededor de esa temperatura). A diferencia de las columnas de vidrio, las de sílice fundida requieren poco tratamiento de su pared interior, además de que el número de fases estacionarias usables con ellas es limitado.

Las columnas capilares pueden tener una longitud hasta 10 veces mayor que las columnas empacadas (10 – 100 m) y un diámetro interno mucho menor (0.1 – 0.75 mm), lo que unido a la ausencia de relleno, las hace mucho más eficientes. Las figuras 11.5. y 11.6. Muestran el efecto de la longitud y el diámetro de la columna sobre la resolución del cromatograma.

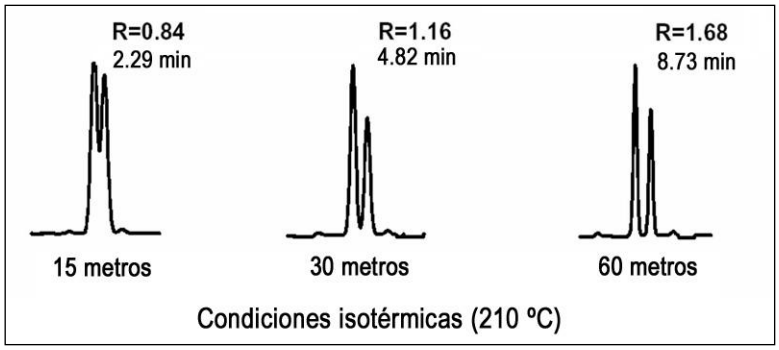


Figura 11.5. Efecto de la longitud de la columna sobre la resolución.

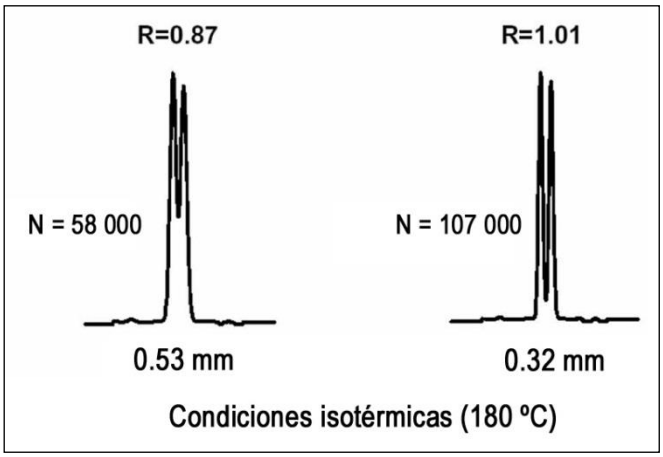


Figura 11.6. Efecto del diámetro interno de la columna sobre la resolución.

El espesor de la pared de las columnas de sílice es diez veces menor al de las columnas de vidrio, y es del orden de 25 micrómetros. Por esto y por la dureza de la sílice, es que estas columnas son tan frágiles y requieren del recubrimiento protector de la poliimida.

El espesor de fase estacionaria tanto de las columnas de vidrio como las de sílice fundida se prepara en el rango de 0,02 a 8 μm.

Acorde a la naturaleza de la superficie interna del capilar, las columnas pueden ser activas y no activas (inertes). Las primeras son selectivas, resisten la contaminación y tienen una vida útil larga, pero son operables solo por debajo de 250 *ºC*. Las columnas inertes no son selectivas, son muy sensibles a la contaminación (mientras más inertes, más fácil se contaminan), pero son operables a temperaturas altas (hasta 400 *ºC*). Su vida útil es corta y depende de la pureza de los extractos que se inyectan.

Las impurezas de peso molecular alto, generalmente poco volátiles, se retienen tanto en las columnas activas como en las inertes. En las primeras, estas impurezas se neutralizan y prevalecen las características de la fase estacionaria, mientras que en las columnas inertes van cambiando paulatinamente la naturaleza del recubrimiento, especialmente cuando este es apolar.

11.3.5.2.2. La fase estacionaria en las columnas capilares

En función de la manera en que esté dispuesta la fase estacionaria en la pared interior de la columna, estas se clasifican en tres tipos:

- **Columna capilar con soporte recubierto** (SCOT, *del inglés Support Cover Open Tubular*). La fase estacionaria está unida a un soporte y este último se encuentra recubriendo la pared interior de la columna.
- **Columna capilar de pared recubierta** (WCOT, *del inglés Wall Cover Open Tubular*). La fase estacionaria está directamente adherida a la pared interior de la columna cromatográfica.
- **Columna capilar de sílice fundida** (FSOT, *del inglés Fusion Silice Open Tubular*). En este caso la fase estacionaria está inmovilizada o químicamente enlazada a la pared interior del capilar.

En los dos primeros casos de columnas capilares, la fase estacionaria está depositada físicamente como una película fina en el interior del capilar, por lo que estas están sometidas a las mismas deficiencias que las columnas empacadas: sangramiento, redistribución de la fase estacionaria y en ocasiones hasta obstrucción del capilar.

En las columnas capilares de sílice fundida la inmovilización consiste en unir químicamente entre sí algunas moléculas de la fase estacionaria o éstas con la pared de la columna. En ocasiones tiene lugar los dos tipos de enlace.

Las ventajas de la inmovilización son varias:

- La fase estacionaria no se desplaza de su posición, aun en zonas cerca del inyector donde está sometida a solventes o vapores concentrados de éstos, por lo que la uniformidad del recubrimiento permanece constante durante mucho tiempo.

- La columna puede ser lavada con solventes, lo cual contribuye a que esta recobre su eficiencia después de un período prolongado de trabajo.
- La inmovilización es imprescindible en caso de recubrimientos con un espesor de la película > 2 μm.

En la tabla 11.3 Se relacionan las fases estacionarias más empleadas en columnas capilares de sílice fundida.

Tabla 11.3.

Fases estacionarias para columnas de sílice fundida

Composición	Polaridad	Límite (en °C)	Aplicaciones
100 % goma de dimetilpolisiloxano	No polar	-60 a 325	Fenoles, hidrocarburos, aminas, pesticidas, PCBs, compuestos de azufre.
100 % fluido de dimetilpolisiloxano	No polar	0 a 280	Derivados de aminoácidos, aceites esenciales.
5 % fenil y 95 % dimetilpolisiloxano	No polar	-60 a 325	Ácidos grasos, alcaloides, ésteres metílicos, drogas, compuestos halogenados.
14 % cianopropil y fenilpolisiloxano	Intermedia	-20 a 280	Drogas, esteroides, pesticidas.
50 % fenil y 50 % metilpolisiloxano	Intermedia	60 a 240	Drogas, esteroides, pesticidas, glicoles.
50 % cianopropil metil y 50 % fenil metilpolisiloxano	Intermedia	60 a 240	Ácidos grasos, ésteres metílicos, acetatos de aditoles.
50 % trifluoropropil polisiloxano	Intermedia	45 a 240	Aromáticos, compuestos halogenados.
Polietilenglicol modificado con TPA	Polar	60 a 240	Ácidos, alcoholes, aldehídos, acrilatos, cetonas, nitrilos.
Polietilenglicol	Polar	60 a 220	Ácidos, alcoholes, éteres, aceites esenciales, glicoles, solventes

En la tabla 11.4 Aparece una comparación de las principales características de las columnas capilares y empacadas para cromatografía gaseosa.

Tabla 11.4.

Propiedades y características de las columnas analíticas para cromatografía de gases

	FSOT	WCOT	SCOT	Empacada
Longitud, m.	10-100	10-100	10-100	1-6
Diámetro interno, mm.	0.1-0.53	0.25-0.75	0.5	2-6
Eficiencia, platos/m.	2000-4000	1000-4000	600-1200	500-1000

	FSOT	WCOT	SCOT	Empacada
Cantidad de muestra, ng.	10-75	10-1000	10-1000	$10\text{-}10^6$
Presión relativa.	Baja	Baja	Baja	Alta
Velocidad relativa.	Rápida	Rápida	Rápida	Lenta
Inactividad química.	Excelente	Muy buena	Buena	Mala
Flexible.	Si	No	No	No

FSOT: Columna capilar de sílice fundida, **WCOT:** Columna capilar de pared recubierta, **SCOT:** Columna capilar con soporte recubierto

11.3.6. El horno

La columna cromatográfica se encuentra situada en un horno aislado térmicamente. En la mayoría de los equipos la temperatura del horno puede fijarse en cualquier valor entre 50^oC y 350^oC. Equipos especiales poseen "hornos" operables por debajo de 0^oC y hasta 500^oC. Un accesorio, llamado programador, permite variar la temperatura del horno en función del tiempo dentro de los límites permisibles del equipo. La forma y velocidad con que la temperatura del horno varía en función del tiempo son prefijadas de antemano por el operador de acuerdo al problema analítico a resolver.

Cuando el análisis cromatográfico se realiza con el horno situado a una temperatura fija, se dice que la operación es isotérmica. Si por el contrario la temperatura varia siguiendo una cierta ley (mediante el programador) se dice entonces que el análisis se realiza con programación de temperatura.

La temperatura que más afecta la separación cromatográfica es la del horno. Consideremos que tanto la temperatura de la cámara de inyección como la del detector son adecuadas para resolver un problema y analicemos solamente la del horno. Cada compuesto tiene una temperatura con la cual se optimiza su paso a través de la columna. Como es lógico, en una muestra con varios constituyentes diferentes, habrá que elegir una temperatura con la cual se cromatografien bien todos ellos. Esa temperatura se encuentra experimentalmente. Si se está trabajando isotérmicamente a una temperatura dada y la resolución de algunos picos es insuficiente, da muy buenos resultados disminuir esta. Con ello se logra que se haga más marcadas las pequeñas diferencias de solubilidad hacia la fase líquida que pudieran tener los constituyentes que eluyen muy próximos, diferenciándose sus valores de *K*. Esto es suficiente para mejorar la resolución.

La figura 11.7 muestra el efecto de la temperatura sobre la separación cromatográfica.

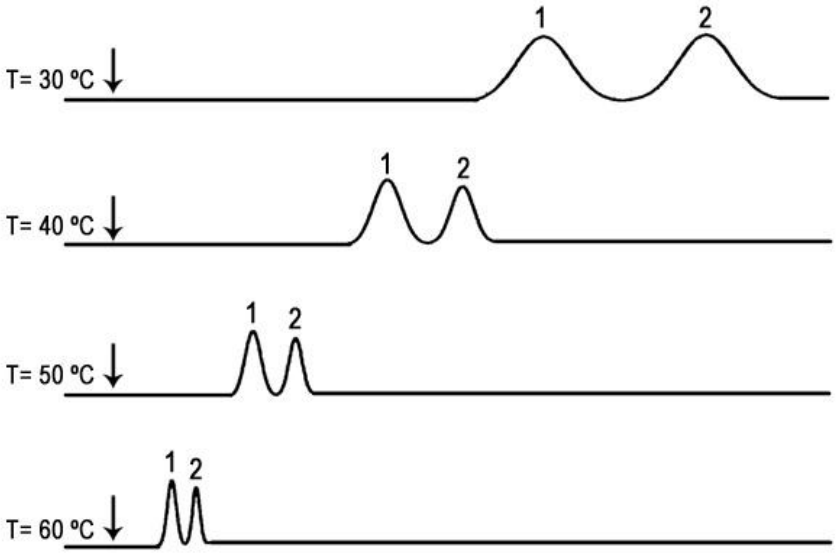


Figura 11.7. Efecto de la temperatura sobre la separación cromatográfica. *Nótese que al aumentar la temperatura disminuyen los tiempos de retención (tr) de los compuestos separados, así como también el ensanchamiento de banda. En el ejemplo considerado es beneficioso incrementar la temperatura por cuanto se pretende disminuir los tr, sin embargo, en el caso que se obtengan cromatogramas con picos solapados a bajos tiempos de retención, convendría disminuir la temperatura para mejorar la resolución.*

Sin embargo, la cromatografía isoterma no permite de forma general una adecuada separación, cuando los componentes tienen puntos de ebullición (p.e.) muy distintos. A bajas temperaturas se separan bien las sustancias de p.e. bajo, pero no las de p.e. alto, que permanecen en la fase estacionaria. Por el contrario, a temperaturas elevadas los especímenes de mayor p.e. emergen separados, pero las fracciones más volátiles pasan con demasiada rapidez, sin ser diferenciados. Por otra parte, la ebullición hace que los componentes estén la mayor parte del tiempo en fase de vapor y a temperaturas muy bajas las muestras se difunden, disminuyendo el número de platos teóricos (*N*).

11.3.6.1. Cromatografía a temperatura programada

Este es el método más difundido a causa de las ventajas que ofrece, además de ser fácilmente practicable por lo sencillo del equipamiento. A diferencia del método isotérmico, en este caso ocurre un aumento gradual de la temperatura de todo el horno. El aumento de la temperatura del horno en función del tiempo está prefijado por el operador del equipo de acuerdo a experiencias previas sobre el comportamiento de la mezcla compleja a resolver. Por esto a este método se le llama cromatografía a temperatura programada.

Si por ejemplo al cromatografiar una mezcla con un rango amplio de puntos de ebullición se usa el método isotérmico, se obtendría un cromatograma como el que muestra la figura 11.8 En este por simplicidad sólo se ha representado dos componentes de bajos, y dos de altos puntos de ebullición.

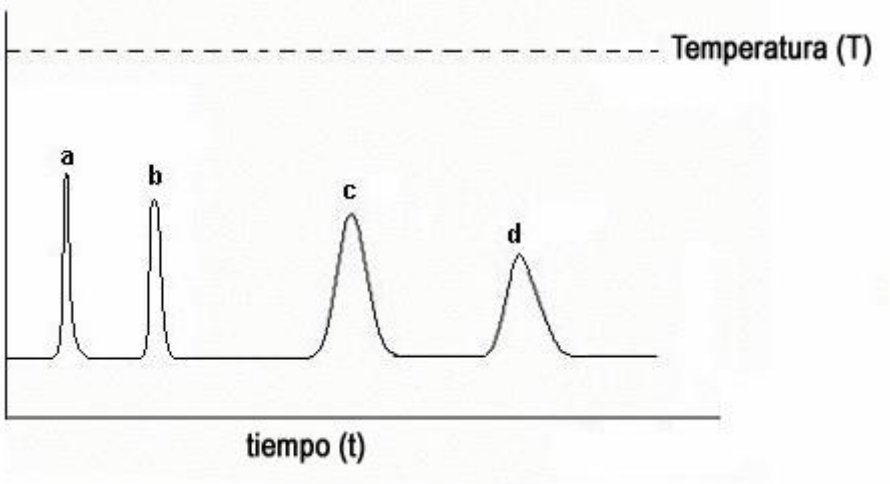


Figura 11.8. Cromatograma isotérmico de una mezcla con diferencias grandes en los puntos de ebullición de los componentes separados.

La misma mezcla puede cromatografiarse a la temperatura *T* hasta que haya eluido el componente *b* y luego subir rápidamente la temperatura hasta un nuevo valor *de* temperatura (Tf) manteniéndola en este hasta la terminación del análisis. El efecto producido por la simple modificación de la temperatura original se muestra en la figura 11.9 en donde, como en la figura 5 se ha incluido el gráfico de *T* en función del tiempo.

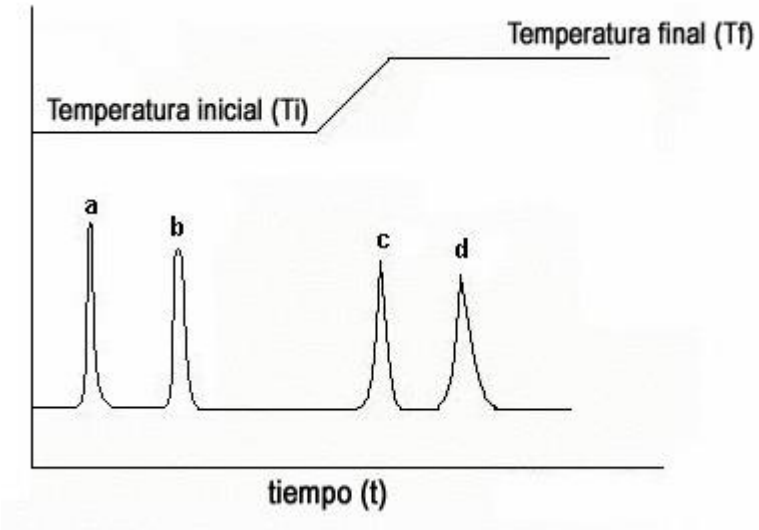


Figura 11.9. Cambio en el valor de la temperatura de operación. S= señal del solvente

Un segundo modo de cromatografiar la mezcla es variando linealmente la temperatura en función del tiempo como se representa en la figura 11.10.

Este tipo de programación tiene mucha importancia en análisis cualitativo debido a que por ejemplo en una serie homóloga los *tr* de sus componentes son función lineal del número de átomos de carbono de cada compuesto. Hay también una relación cuantitativa entre los tiempos de retención y el número de átomos de carbono de los componentes de una serie homóloga cuando esta se cromatografía isotérmicamente, pero en este caso la dependencia es logarítmica.

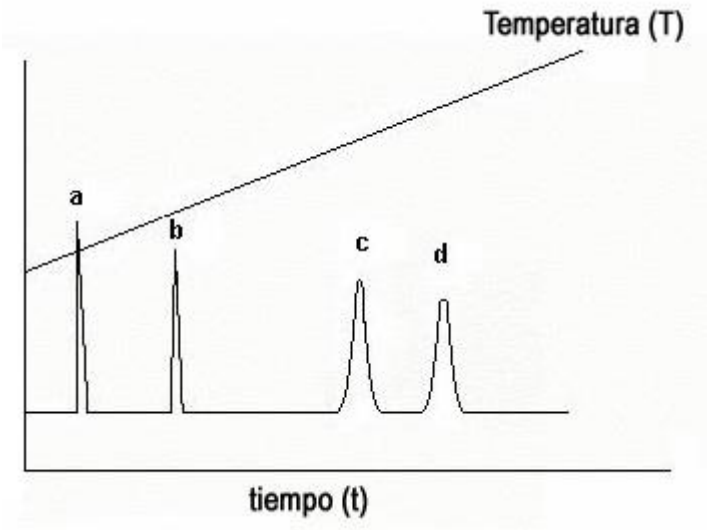


Figura 11.10. Programación lineal de temperatura.

En los ejemplos ilustrados en las figuras 11.5 y 11.6 no se ha tenido en cuenta la alteración de la línea de base que siempre tiene lugar cuando se modifica la temperatura de operación. Así, debido al aumento de la temperatura hay una volatilización sustancial de la fase estacionaria, siendo arrastradas sus moléculas hasta el detector, la respuesta del cual provoca una desviación de la línea de base conocida como deriva. La deriva es de consideración cuando se trabaja a una temperatura superior al límite máximo recomendado para cada fase estacionaria.

La programación escalonada de la temperatura se usa cuando los compuestos están formando dos o más grupos, bastante separados entre sí. La programación lineal se emplea cuando hay una distribución de los compuestos más o menos regular en todo el cromatograma.

Debe señalarse que los programadores modernos permiten realizar programas escalonados de rampas de temperatura con alta complejidad, siendo factible una combinación de ambos tipos de programación. En la figura 11.11 se muestra un programa complejo de rampas de temperatura.

La temperatura programada se emplea cuando los componentes tienen una diferencia apreciable de los puntos de ebullición (> 100 grados) y presenta ventajas apreciables debido a que reduce el tiempo de análisis, produce picos más delgados y presenta mejor reproducibilidad cuantitativa, especialmente en los últimos componentes que eluyen.

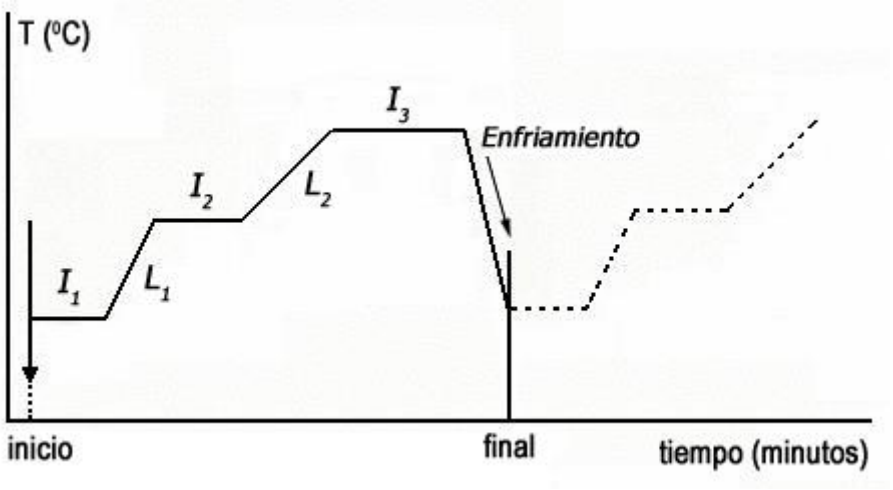


Figura 11.11. Programa complejo de ciclo de programación o rampas de temperaturas. *I_1 representa una operación isotérmica inicial. L_1 muestra un ascenso lineal de la temperatura, E representa la etapa de enfriamiento. En la mayoría de los equipos puede prefijarse las temperaturas y duraciones de I_1, I_2, I_3, etc. Así como las velocidades de ascenso de la temperatura en las etapas L_1, L_2, etc., dentro de rangos bastantes amplios.*

11.3.7. El detector

Gracias al desarrollo de detectores cada vez más sensibles y selectivos ha sido posible a la cromatografía gaseosa abarcar campos muy diversos del análisis químico orgánico. Han sido numerosos los tipos distintos de detectores que se ha ideado para "detectar" y medir las bandas de vapor que eluyen de la columna, basados en algunas propiedades del gas portador que se altera por la presencia en él de los vapores de la muestra.

Los detectores cromatográficos son los dispositivos encargados de señalar la presencia y medir la concentración (o cantidad) de los solutos que eluyen de la columna cromatográfica. Ellos pueden ser de dos tipos fundamentales: integrales y diferenciales.

Los detectores integrales miden la cantidad de un componente eluido y la suman a la totalidad de los valores previamente obtenidos de otros componentes de una mezcla analizada.

Los detectores diferenciales miden la variación instantánea de alguna propiedad física del gas portador que se altera por la presencia de un analito en él. Estos detectores son los más usados en la actualidad.

Tanto los detectores diferenciales como los integrales pueden ser destructivos o no destructivos. En los primeros la muestra se destruye (generalmente se quema) en el momento de la medición, mientras que en los segundos ésta abandona intacta el detector.

11.3.7.1. Características fundamentales de los detectores.

Un detector ideal debe responder igualmente ante cualquier analito bajo cualquier condición de temperatura, flujo y presión. Algunos detectores poseen

una propiedad contraria a ésta, es decir, responden ante compuestos definidos bajo condiciones controladas.

Los criterios de calidad generales que deben considerarse para todo detector son: A. Estabilidad, B. Sensibilidad y límite de detección, C. Respuesta lineal, D. Tiempo de respuesta y E. Volumen interno

A. Estabilidad

Teóricamente la respuesta del detector en ausencia de muestra, es decir, cuando a través de él está pasando solamente el gas portador proveniente de la columna, debe ser una línea recta horizontal. Debido a la presencia en dicho gas portador de impurezas y trazas de fase estacionaria, así como a causa de desequilibrio térmico, la línea de base puede presentar desviaciones instantáneas (ruido), además de desviaciones de la horizontalidad (deriva), que ocurren a mediano y largo plazo.

Tanto el ruido como la deriva son factores que dificultan la buena operación de un detector. La deriva se corrige en la mayoría de los casos dándole un tiempo suficiente de calentamiento al sistema de detección (incluido amplificador y registro). Por manipulación del amplificador puede corregirse la deriva cuantas veces sea necesario. Mayor importancia analítica tiene el ruido de fondo, ya que este limita la cantidad mínima detectable de un analito.

Aunque producen deriva de la línea de base no se consideran como factores de inestabilidad las variaciones de temperatura, presión y/o caudal no previstas. Estos se consideran como defectos del equipo.

B. Sensibilidad y límite de detección

La sensibilidad es la característica que tiene un detector de responder ante pequeñas cantidades de soluto. Si R es la respuesta ante una cantidad Q, se define la sensibilidad S como:

$$S = \frac{\Delta R}{\Delta Q}$$

En la cual ΔR está expresada en mV y ΔQ en ng (pueden usarse otras unidades). La cantidad mínima detectable está relacionada con el ruido y la sensibilidad. Consideremos el gráfico de la figura 11.12. La línea de trazos horizontales es la línea de base teórica. El trazo continuo representa la línea de base real (con deriva). Se considera ruido a la distancia máxima entre los desplazamientos instantáneos del registro por encima y por debajo de la línea de base.

Si se conoce la sensibilidad (S), entonces la cantidad mínima detectable es:

$$Qmin = \frac{2R}{S}$$

o expresado de otra manera $Qmin$ es la menor cantidad de un soluto que produce una señal distinguible del ruido de fondo.

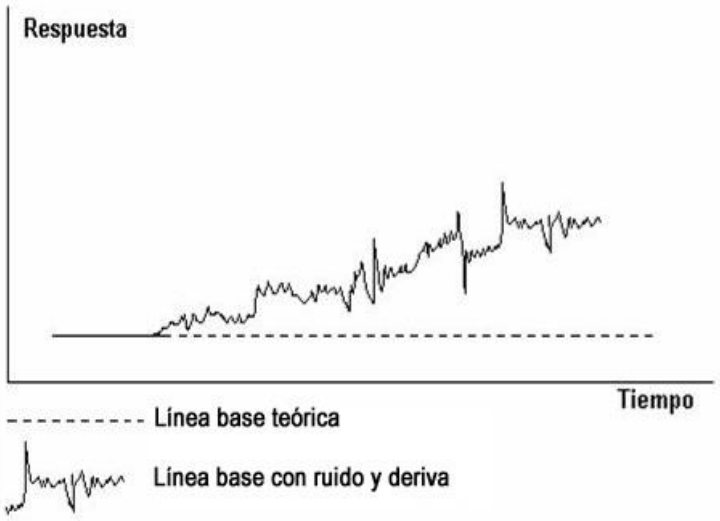


Figura 11.12. Ruido y deriva

C. Respuesta lineal

De todas las propiedades del detector esta es una de las más importantes ya que está relacionada con la cuantificación de los solutos. Hay un rango de concentraciones por encima y por debajo del cual la respuesta del detector no es proporcional a la cantidad (o concentración) de la muestra inyectada.

Las causas de la no linealidad pueden ser de dos tipos: debidas a sobrecarga de la columna y a la saturación del detector.

Cuando se sobrepasa la capacidad de carga de una columna, esto es, cuando la cantidad de muestra es demasiado grande, se aprecia esto en el cromatograma, ya que deja de ser lineal la relación tamaño de muestra-altura de pico, además, el tiempo de retención se acorta respecto al valor del tr del mismo compuesto, pero en el caso que no satura la columna; en este caso el pico tiene un frente casi vertical, con una cola prolongada. Si por el contrario la columna admite perfectamente la muestra inyectada pero esta cantidad es demasiado grande para que el detector de una respuesta lineal, entonces, esto se refleja en el área del pico, la cual deja de ser proporcional con el tamaño de la muestra inyectada.

Aunque el dato del rango lineal es importantísimo en análisis cuantitativo, los valores reportados en la literatura son solo indicativos ya que no dependen solamente del detector. Pero más importante aún, dependen además del tipo de detector, de sus características y estado de funcionamiento.

Por tales razones es imprescindible determinar el rango lineal de respuesta para el detector en las condiciones en que se vaya a realizar el análisis. Para ello se inyectan iguales volúmenes de soluciones del patrón analítico de la muestra que se vaya a analizar, de concentraciones crecientes. Se grafica la concentración (o

cantidad) de muestra inyectada contra la altura y el área de pico, determinándose a partir de qué valor de inyección deja de ser lineal la respuesta. En la práctica se trabaja en la mitad del rango para tener un buen margen de seguridad que incluye la eventual suciedad del detector.

D. El tiempo de respuesta

El tiempo de respuesta se define generalmente como el lapso de tiempo que requiere un detector para reaccionar ante el 60 % del cambio brusco de la concentración del analito en el gas portador.

En realidad el tiempo de respuesta no depende solo del detector sino del conjunto llamado sistema de detección y registro (detector, amplificador y registrador). El tiempo de respuesta es muy importante en trabajos complicados de separación en donde es imprescindible que el sistema de detección sea capaz de detectar y registrar los solutos eluidos muy próximos entre sí. En los buenos detectores este tiempo de respuesta es de 1 segundo o menos. Cuando se describa en particular los detectores, se hará referencia a esto de nuevo.

E. Volumen interno del detector

Es una característica del detector que depende de su diseño y construcción. El volumen interno del detector ha de ser el menor posible, ya que éste afecta el tiempo de respuesta, la sensibilidad, la resolución, la forma del pico y hasta el tiempo de retención.

11.3.7.2. Descripción del principio y aplicaciones de algunos detectores de gran uso

En lo que sigue se describirá los detectores más utilizados en la actualidad. Algunos de estos tienen utilidad amplia y diversificada en analítica. Otros como el termoiónico, debido a su alta selectividad, tienen contados campos de aplicación, pero de extraordinaria importancia, como son los medicamentos y los plaguicidas.

11.3.7.2.1. Detectores de conductividad térmica

Estos detectores, llamados también cátarometros o detectores de hilo caliente (TCD, del inglés *Thermical Conductivity Detecto*r) han sido usados extensamente hasta el surgimiento del detector de ionización por llama, el cual le ha restado popularidad y aplicación. No obstante, aquel continúa en uso, especialmente cuando no se requiere una sensibilidad grande y si una buena estabilidad. Estos detectores son simples en su funcionamiento, estables y versátiles.

El principio en que se basa el detector de conductividad térmica es el siguiente: el gas portador en estado puro tiene una conductividad térmica a una temperatura determinada. Cuando con el gas portador llega vapor de un analito al detector, la conductividad térmica de esta mezcla gaseosa es menor que la del portador puro. Un filamento que se encuentre a una temperatura de equilibrio cuando pasa gas portador solamente, se calentará al pasar la mezcla portador-

muestra, ya que como se señaló, su conductividad es menor. Este aumento de la temperatura del filamento se traduce en un incremento de su resistencia el cual es proporcional a la concentración del vapor de la muestra.

Hay otros detectores de conductividad que no utilizan filamentos sino termistores. Estos son semiconductores que operan a la inversa del filamento, ya que al calentarse disminuyen su resistencia. También en este caso la disminución de la resistencia es proporcional al tamaño de la muestra inyectada.

En la práctica es poco preciso y difícil medir la variación de la resistencia de un solo filamento, razón por la cual en los detectores de este tipo se hace uso de dos columnas cromatográficas iguales. Por una de estas pasa solamente gas portador. Es la columna llamada de referencia. Por la otra circula el gas portador con la muestra que eventualmente se inyecta. Ambas columnas se conectan al mismo detector cuyos elementos sensibles están dispuestos en forma de puente Wheatstone, como el representado en la figura 11.13, donde se incluye el esquema de un detector de conductividad térmica. Mediante la resistencia variable Rv se fija la temperatura de los filamentos (de medición y referencia) no debiendo estar ésta por encima de 250 *ºC*. Operando el botón AZ que no es más que otra resistencia variable, se equilibra el circuito. Con ello la aguja del registrador cae en escala. Cuando junto con el gas portador entra un soluto en la rama de medición, la conductividad de esta mezcla es menor como ya se indicó. El filamento (o el termistor) se calienta y su resistencia sube (o baja) produciéndose un desbalance en el puente, el cual se registra como un pico.

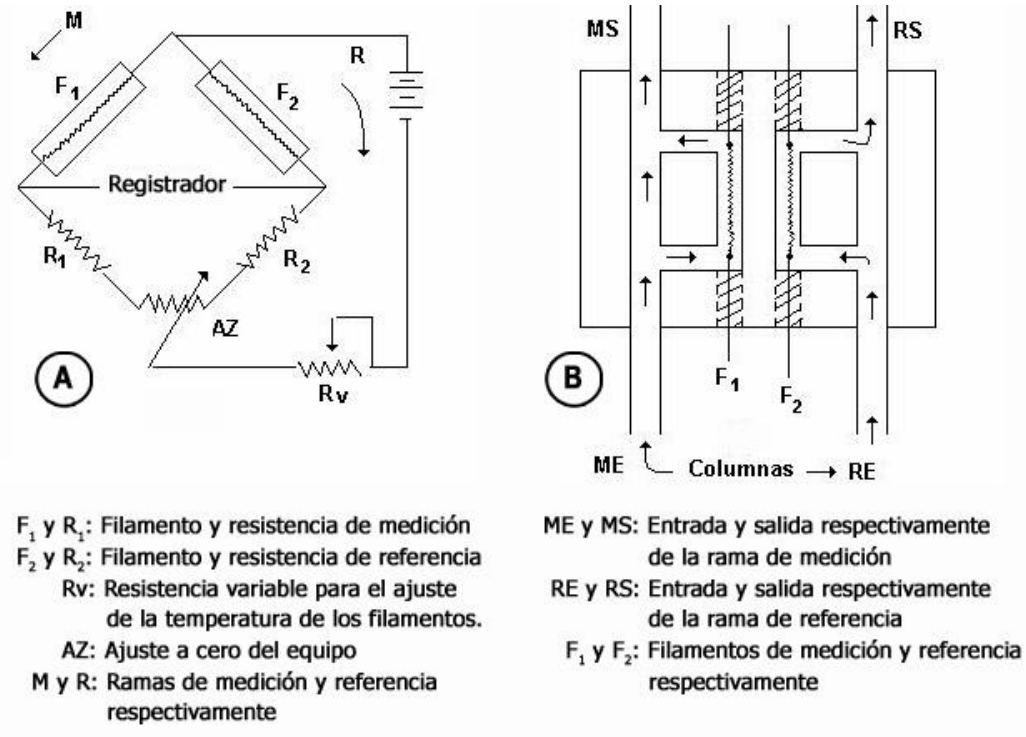


Figura 11.13. Detector de conductividad térmica (TCD)

La conductividad térmica de los gases portadores y los compuestos orgánicos en general se muestran en la tabla 11.5.

Tabla 11.5. Conductividad térmica de los gases portadores y de los compuestos orgánicos.

Gas portador	***Cal/cm.seg.grado x 10^5* a 100 *ºC***
Argón	5,2
CO_2	5,3
N_2	7,5
He	41,6
H_2	53,4
Comp. Orgánicos	< 7 (generalmente)

Los valores de conductividad térmica para la mayoría de los compuestos orgánicos decrecen con el aumento del peso molecular de cada compuesto.

El tiempo de respuesta en estos detectores está relacionado con las características constructivas, pudiendo variar desde 0,02 *segundos* hasta 10 *segundos*. En los detectores de filamento, el tiempo de respuesta depende fundamentalmente de la colocación de estos dentro del detector. Algunos filamentos están situados directamente en la corriente del gas portador y entonces el tiempo de respuesta es mínimo, pero se presenta fenómenos de ruido ya que están expuestos a las variaciones de presión y de flujo. En otros casos los filamentos están situados en una ramificación de la columna, en este caso el tiempo de respuesta es mayor pero la estabilidad del detector es muy buena.

En el caso especial de los detectores que utilizan termistores, el tiempo de respuesta es además inversamente proporcional al diámetro del elemento sensible.

Por encima de 100 *ºC* se utilizan los detectores de hilo caliente, los cuales aumentan la sensibilidad con la temperatura. Por debajo de 100 *ºC* son más sensibles los detectores de termistores.

Los detectores de conductividad térmica tienen aplicación en la determinación de cualquier tipo de compuestos cuando no se requiera una sensibilidad alta. No ha podido ser sustituido por el detector de ionización por llama en la determinación de gases permanentes.

El límite de detección es del orden del microgramo (μg) y el rango de respuesta lineal es muy amplio (10^4-10^5).

11.3.7.2.2. Detector de ionización por llama

Este tipo de detector FID (del inglés *Flame Ionization Detector*) se desarrolló a partir de 1958 alcanzando actualmente un amplio uso. Es mucho más sensible que el de conductividad térmica, muy estable y versátil, aunque a diferencia del

anterior mencionado, su influencia está influida por la estructura química de los compuestos analizados.

El principio en que se basa este detector es muy simple. Una llama de Hidrógeno produce una ionización de las moléculas gaseosas que la rodean. Si esta llama se encuentra en un campo eléctrico fuerte, los iones migran de acuerdo a sus cargas respectivas hacia los electrodos de carga opuesta, estableciéndose una corriente, la cual es débil. Sin embargo, cuando un compuesto carbonado se quema en esta llama, la formación de iones es grande, la corriente producida es perfectamente medible y dentro de ciertos límites, proporcional a la cantidad de compuesto que ha pasado por el detector.

Es interesante señalar que la respuesta de este detector es nula en ausencia de oxígeno. Se ha podido establecer que la energía de ionización proviene de la oxidación del carbono. Así por ejemplo, un compuesto en el cual el carbono se encuentre parcial o totalmente oxidado, no será detectado por el detector de ionización por llama. La detección se basa pues en un fenómeno físico-químico, específicamente termoquímico. Por tal razón es lógico pensar que la respuesta de este detector estará en parte condicionada por la estructura química de los compuestos a analizar. De hecho así ocurre. Digamos por ejemplo que en dos moléculas con igual número de átomos de carbono, la respuesta será mayor en la más insaturada de ambas. En series homólogas distintas, en igualdad de moles inyectados, la respuesta del detector será proporcional al número de átomos de carbono de cada compuesto no unido directamente a oxígeno. La respuesta también es menor en la medida en que hay sustituidos en la molécula carbonos por heteroátomos.

El efecto de la estructura química sobre la sensibilidad del detector de ionización por llama es relativamente pequeño. Mayor importancia tiene la temperatura de la llama y el voltaje aplicado. La temperatura de la llama condiciona la formación de iones, siempre que la cantidad de oxígeno presente no sea limitante. Pero en realidad esto solo no produce un aumento de sensibilidad. Se requiere un voltaje adecuado, de modo que la mayoría de los iones formados lleguen a los electrodos colectores sin que ocurran fenómenos de recombinación iónica. En la mayoría de los diseños de detectores de ionización por llama la colección de los iones formados es máxima para un voltaje aplicado de 250–300 V. Este voltaje aplicado es un parámetro constructivo del detector que no puede variarse, de modo que si el analista necesita variar la sensibilidad de su detector, tendrá que variar los flujos de los gases, especialmente el del Hidrógeno o recurrir al amplificador electrométrico. La 11.14 muestra el esquema de un detector de ionización por llama. El hidrógeno se mezcla con el gas portador poco antes de la entrada al detector. El aire se hace llegar directamente al detector adquiriendo un flujo laminar después de pasar a través de un difusor. De esta forma se evita que la llama oscile, produciendo ruido de fondo.

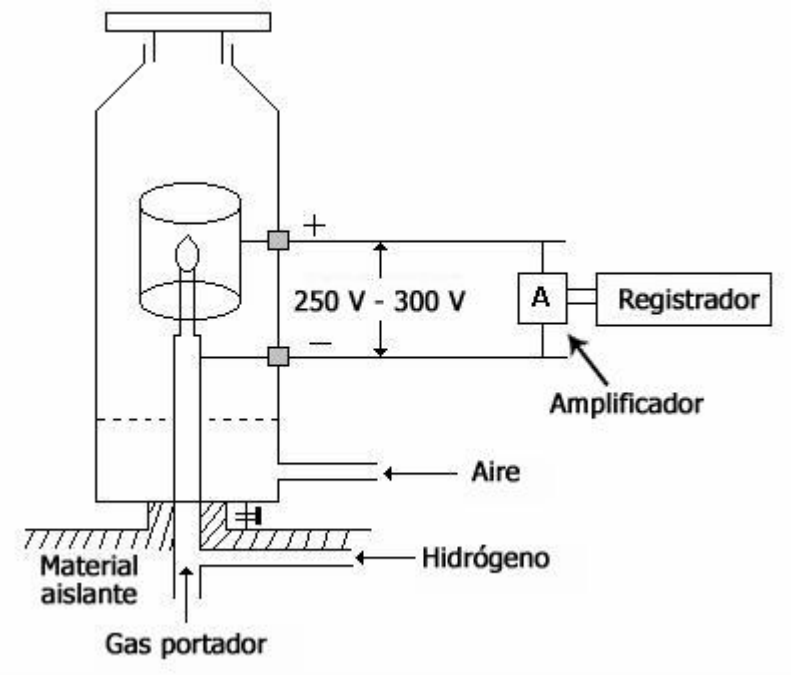


Figura 11.14. Detector de ionización por llama (FID)

Este detector tiene un tiempo de respuesta muy pequeño, prácticamente responde de inmediato ante los compuestos que se queman, razón por la cual es aplicable aún en caso de separaciones difíciles. El ruido en condiciones normales de operación es bajísimo. Su rango lineal es muy grande del orden de 10^5. Su utilización no requiere de gases portadores muy puros. Además se puede usar todos los gases portadores, incluso el Hidrógeno. Las muestras pueden inyectarse en cualquier solvente que se queme, pero preferentemente en alcoholes, cetonas y esteres de baja masa molecular. En algunos casos se ha usado agua como solvente para inyectar la muestra, sin deterioro y/o merma de la calidad de la respuesta.

Como se ha mencionado, su uso es general, aunque su respuesta es pobre para compuestos carbonados con heteroátomos en su estructura, principalmente el cloro. No responde ante compuestos tales como los gases nobles, CO_2, O_2, CS_2, COS, SO_2, NO, N_2O, NO_2, NH_3, etc.

El límite de detección de este detector es de $10^{-8}g$ pero en el trabajo cotidiano, donde verdaderamente rinde frutos, es en la determinación de cantidades mayores, del orden de los microgramos.

11.3.7.2.3. Detector de captura electrónica

El detector de captura electrónica (ECD, del inglés *Electrón Capture Detector*)) Es un detector de ionización altamente sensible, aunque su selectividad es baja. Por tal razón ha sido usado en campos muy diversos del análisis y de la química en general. Es un arma muy útil en la determinación de trazas de compuestos con afinidad electrónica, especialmente los organoclorados.

El principio de operación de este detector es inverso al de los detectores de ionización descritos. Una fuente "F" radiactiva (Ni^{63}, Sr^{90} o Tritio, (figura 11.15) emite electrones los cuales ionizan las moléculas del gas portador que atraviesa la cámara. Las moléculas de gas portador se convierten en emisores secundarios, produciéndose una corriente de electrones que es captada en el ánodo, el cual está a un potencial positivo respecto a las paredes emisoras. Esta corriente electrónica es llamada corriente de fondo y es del orden de 10^{-9} Amperes para la mayoría de los detectores, aunque es un parámetro de diseño.

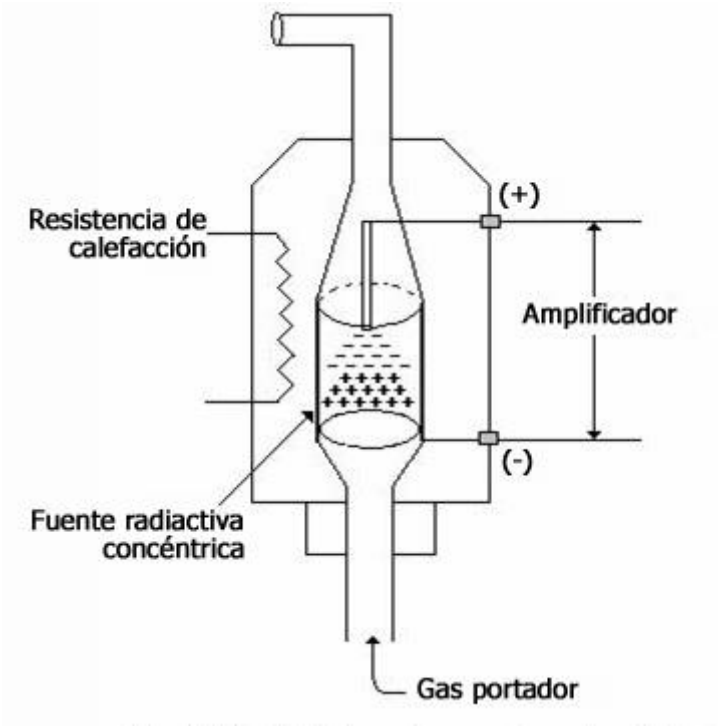


Figura 11.15. Detector de captura electrónica (ECD)

Debido a su poca masa, los electrones son rápidamente colectados por el ánodo, mientras que se forma una zona de iones positivos de gas portador e impurezas ionizadas, los cuales migran lentamente hacia las paredes radiactivas de la fuente F. Bajo condiciones de equilibrio operacional, en el detector se forman dos zonas como las representadas en la citada figura 11. Cuando un compuesto con afinidad electrónica entra en la cámara de ionización, capta electrones y entonces disminuye el valor de la corriente de fondo. Bajo ciertas condiciones el valor de esta disminución es proporcional a la cantidad de soluto que pasa por la cámara y a su afinidad electrónica.

Los iones negativos del compuesto también pueden colectarse en el ánodo pero en realidad esto ocurre poco ya que los electrones se mueven mucho más rápidamente. Además hay posibilidad de neutralización de las cargas en la zona positiva. De hecho el detector de captura electrónica hace uso de esta recombinación iónica de modo que el fenómeno de la detección sea lo más posible de captura electrónica pura.

Una vez que ocurrió la recombinación iónica y que las moléculas de analito abandonaron el detector, se restablece el equilibrio eléctrico, volviendo a tomar la corriente de fondo su valor normal.

La tabla 11.6 muestra las afinidades electrónicas para un grupo de compuestos, así como los valores esperados en caso que una molécula posea en su estructura un número determinado de átomos de halógenos, grupos nitro, etc.

Tabla 11.6.

Compuestos o grupos con afinidad electrónica

Compuesto	Coeficiente de adsorción electrónica
• Hidrocarburos alifáticos • Hidrocarburos aromáticos • Alcoholes • Aldehídos • Cetonas	< 0,1
• Compuestos monoclorados • Compuestos trifluorados	0,1 – 10
• Compuestos diclorados • Compuestos monobromados	10 – 100
• Compuestos triclorados • Compuestos dibromados • Compuestos monoyodados • Compuestos mononitros • Compuestos alquil-metales	100 – 1000
• Compuestos tetraclorados • Compuestos tribromados • Compuestos diyodados • Compuestos dinitros	1000 - 10000

Los valores de la tabla son un índice de la respuesta relativa de los compuestos relacionados en ella. Sin embargo hay que tener muy en consideración, por ejemplo, que un compuesto tetraclorado no necesariamente posee una sensibilidad mayor que uno triclorado o diclorado. Esto es cierto solo en el caso que lleguen al detector cantidades equivalentes de estos compuestos (suponiendo que no se descompongan, adsorban o retengan de modo diferente en su paso a través de la columna).

De inmediato se puede recomendar como solventes para captura electrónica todos aquellos comprendidos en el primer grupo (con coeficiente de adsorción< 0,1). Es requisito que el solvente que se utilice esté lo más seco posible ya que el agua produce una respuesta del detector que afecta la determinación que se realiza.

El rango lineal de este detector es muy pequeño del orden de 10^2-10^3. Depende como es natural del compuesto específico.

La sensibilidad es grande. El límite de detección es del orden de los *picogramos*. Sin embargo, en los trabajos ordinarios, el límite de detección está determinado por el grado de purificación de los extractos a analizar, encontrándose entre las décimas y las centésimas de nanogramo para los organoclorados.

11.3.7.2.4. Detector termoiónico

Este detector es una modificación del de ionización por llama. Fue introducido en 1964. Sufrió modificaciones y perfeccionamientos sucesivos hasta la fecha. Su aplicación está limitada a un grupo de compuestos ya que este es altamente selectivo. Debido a su elevada sensibilidad, ha sido utilizado en la determinación de trazas de esteres fosfóricos y compuestos nitrogenados, de tanta importancia en biomedicina, bioquímica y química de plaguicidas.

Las modificaciones y perfeccionamientos tecnológicos en el desarrollo del detector termoiónico se adelantaron algo a los conocimientos teóricos que explican su principio. No obstante se sabe que cuando se quema un compuesto orgánico que tiene en su estructura átomos de P, N, S o halógeno, en presencia de vapores de una sal de sodio, de potasio, rubidio o cesio se produce una corriente iónica muy grande si se compara con la ionización que debía esperarse en caso de un detector de llama normal.

La respuesta del detector termoiónico depende del heteroátomo presente y de su cantidad. En igualdad del número de heteroátomos, la respuesta del DTI (detector termoiónico) respecto a un compuesto orgánico carbonaceo puro equimolar es 10 veces superior para compuestos con cloro o azufre; de 100 – 150 veces cuando el heteroátomo es nitrógeno y entre 1000 y 10000 veces mayor cuando el compuesto tiene fósforo en su estructura. Expresando lo mismo de otra forma. Supongamos que un éster fosfórico contiene solo P como heteroátomo y el resto de su estructura son átomos de carbono. Cuando este compuesto se analiza con un DTI produce, por ejemplo, una altura de pico de 5 *cm* para 1 *ng* de muestra. Un compuesto análogo, pero con N en lugar de P requiere de 7 *ng* – 10 *ng* para dar una respuesta equivalente; si el heteroátomo fuera Cl o S, entonces se requerirían unos 100 *ng*; unos 1000 *ng* de compuesto puro serían necesarios como mínimo para dar un pico análogo al del compuesto fosforado.

La figura 11.16 muestra un esquema del diseño de un detector termoiónico.

Respecto a la selectividad de la respuesta del DTI y el tipo de sal usado, los resultados obtenidos han sido contradictorios. Se plantea por algunos autores que la sensibilidad hacia compuestos nitrogenados aumenta cuando se usa sales de rubidio, pero otros señalan las sales de Cesio como las mejores para los organofosforados.

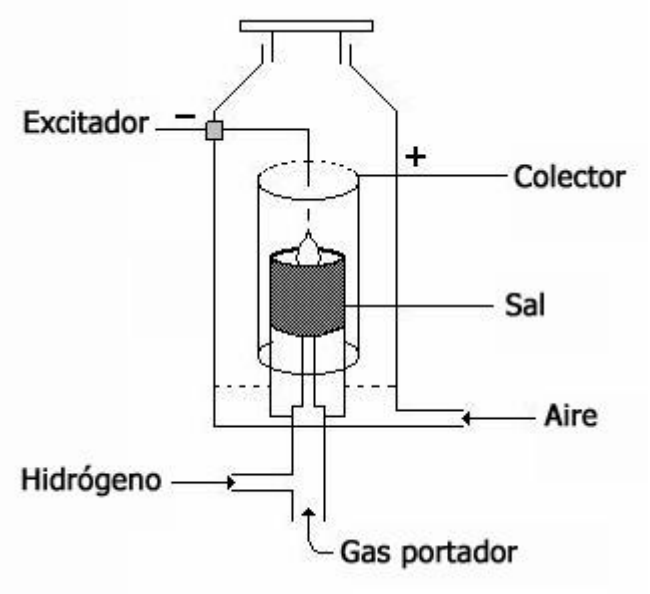


Figura 11.16. Detector termoiónico

Los detectores termoiónicos responden específicamente ante cada compuesto de acuerdo a su composición química particular. Influye sobre todo el número de átomos de P, N, S, Cl, etc., pero también la estructura del compuesto, aunque está en menor grado. Por estas razones, al cuantificar una señal obtenida con un DTI se requiere disponer del patrón analítico o del dato de respuesta relativa del compuesto respecto a un patrón conocido.

Debido a la sensibilidad alta y selectividad de respuesta, los extractos para analizar por DTI no requieren una purificación rigurosa. En la mayoría de los casos se pueden analizar directamente sin previa purificación.

11.3.7.2.5. Detector fotométrico de llama

El detector fotométrico de llama (DFLL) puede ser usado en la determinación de compuestos orgánicos de fósforo y la única vía práctica cuando se requiere determinar compuestos organoazufrados. En efecto, el detector fotométrico, en su modalidad de detección de fósforo (DFLL–P) es uno de los detectores de cromatografía de gases más selectivos. Sin embargo, en su modalidad de azufre (DFLL–S), es menos selectivo pues, cantidades grandes de compuestos organofosforados pueden interferir en la determinación. También en esta modalidad la respuesta es lineal solamente en escala semilogaritmica. No obstante, este detector es muy útil en el análisis cualitativo por su selectividad elevada, especialmente cuando se requiere confirmar la identidad de un analito en base a la relación de las respuestas P/S.

La muestra llega al detector y se quema en una llama de Hidrógeno, en una atmósfera rica en oxígeno. Cuando la muestra es un compuesto órgano fosforado u organoazufrado genera una emisión óptica típica, al descomponerse en la llama de Hidrógeno.

Esa radiación se filtra a través de un filtro de interferencia de banda estrecha. Si el filtro seleccionado tiene una transmitancia máxima a 526 *nm*, correspondiente a la longitud de onda de emisión del producto HPO, permite la detección de compuestos organofosforados, si el filtro permite el paso de radiación a 394 nm, permite la detección de compuestos orgánicos de azufre. La luz filtrada a través de cualquiera de los filtros de interferencia llega a un tubo fotomultiplicador, el cual la convierte en una respuesta eléctrica.

La figura 11.17 muestra un esquema simplificado de un detector fotométrico de llama.

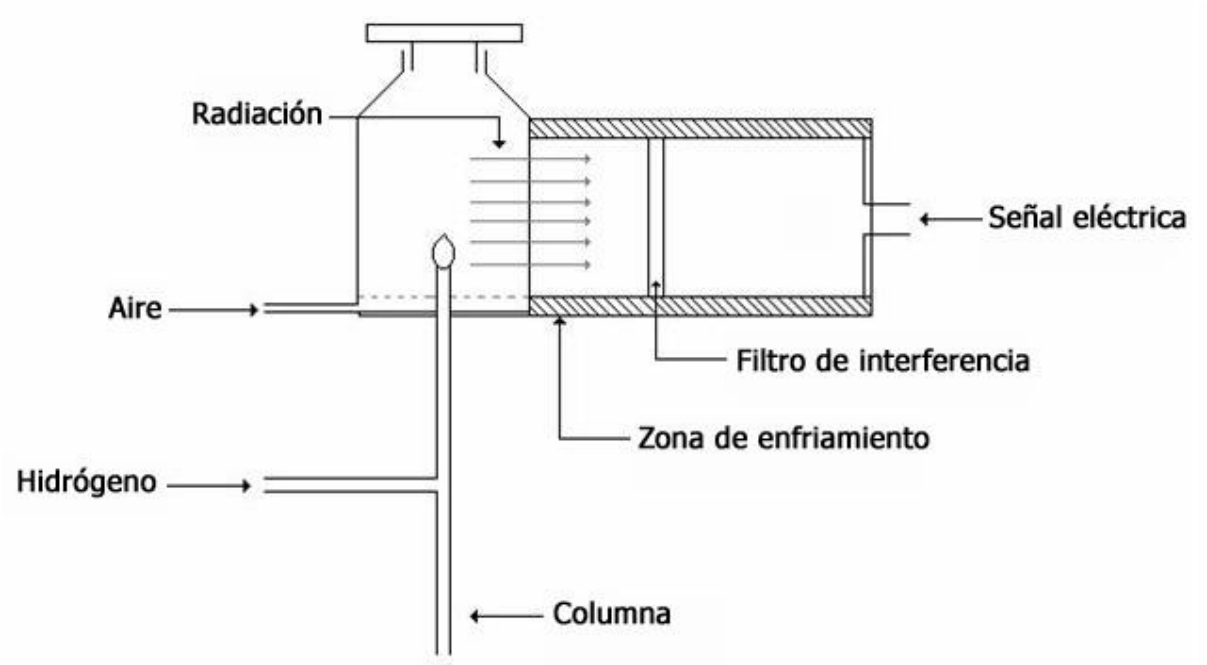


Figura 11.17. Detector fotométrico de llama

En algunos equipos, el filtro de interferencia es intercambiable. El analista puede sustituir el de fósforo por el de azufre con facilidad. Hay detectores que tienen instalados los dos filtros. Cualquiera de ellos, acorde a la muestra que se analiza, puede situarse, mediante una manipulación simple, en la posición para hacer la medición.

La respuesta del detector fotométrico de llama en su modalidad de fósforo es de 10^4 a 10^5 veces mayor respecto a la respuesta al carbono. La selectividad de la determinación de organofosforados en presencia de interferencias organoazufradas es menor y depende considerablemente de la concentración del contaminante, por lo que debe determinarse con patrones analíticos.

La selectividad, S/C varía considerablemente con la concentración del organoazufrado. Para valores altos de estos compuestos, la relación de respuestas S/C es grande (10^5 – 10^6), mientras que si la concentración de la muestra es baja, esta relación es solo 10^4.

Algo análogo ocurre con la respuesta a compuestos de azufre en presencia de organofosforados. En este caso la selectividad S/P está en el rango 10^1 – 10^4, dependiendo de la concentración del organofosforado. En este caso también es preciso determinar la concentración interferente y su influencia sobre la respuesta requerida del detector.

La sensibilidad de este detector en los dos modos (P, S) es muy buena, aunque el límite de detección para organofosforados es 3 o 4 veces más bajo que para compuestos de azufre. Debido a la estabilidad alta y al ruido bajo de este detector, se alcanza límites de detección muy bajos, del orden de 0,01 *ng* para organofosforados y 0,04 *ng* – 0,05 *ng* para compuestos orgánicos de azufre.

El rango lineal de respuesta en la modalidad de fósforo es de 10^4. El rango correspondiente para organoazufrados es menor. La respuesta en la modalidad S no es lineal pero esto no es un inconveniente. Los equipos modernos linearizan automáticamente la señal expresándola como la raíz cuadrada. Algunos analistas prefieren trabajar con la señal no modificada y graficarla directamente en papel semilog contra la masa de muestra inyectada, lo cual es más exacto.

11.3.7.2.6. Acoplamiento Cromatografía Gaseosa – Espectroscopia de Masas (GC-MS).

El primer intento reportado de acople directo CG – MS fue llevado a cabo por Gohlke en 1959 pero es preciso recordar que por entonces todavía no se habían desarrollado las columnas capilares, por lo que los flujos de gas portador eran grandes, y era preciso además usar splitters para introducir fracciones que fueran compatibles con el MS. Ya en 1968, Scalan describió la utilidad del acople CG Capilar – MS. La elevadísima resolución de la cromatografía gaseosa capilar permitía la introducción de compuestos muy puros (muy resueltos), en volúmenes gaseosos pequeños, compatibles con los sistemas de vacío de los MS en uso por entonces. Este desarrollo fue asistido también desde épocas tempranas, por el uso de las computadoras, que aunque no tenían las posibilidades de las de hoy fueron decisivas para promover el desarrollo alcanzado en el presente.

En la actualidad el desarrollo alcanzado en la electrónica, las computadoras y la mecánica fina ha permitido la fabricación de cromatógrafos gaseosos acoplados a espectrógrafos de masas muy compactos, pequeños y fáciles de operar.

En el epígrafe 9.3.6.7 del capítulo 9, se trató acerca de la importancia analítica del acoplamiento HPLC–MS), y se dio una explicación del principio de funcionamiento de un espectrómetro de masas.

En el acoplamiento GC-MS juega un papel importante la interfase que permite el acople de la masa gaseosa a la salida de la columna capilar con la fuente iónica del espectrómetro de masas.

Durante el paso a través de la interfase, el efluente de la columna cromatográfica pierde presión (desde la atmosférica a la salida de la columna, hasta el valor de

vacío requerido por la fuente de ionización del MS). En este proceso se eliminan fundamentalmente las moléculas del gas portador (tienen una difusión mayor debido a su masa molecular baja) y llegan a la fuente de ionización casi exclusivamente las moléculas que corresponden a un tiempo de retención dado. Por esto tiene mucha importancia la naturaleza del gas portador que se use. Teóricamente con hidrógeno se obtiene los mejores resultados pues su difusión es muy grande. Pero su uso siempre está asociado al riesgo de explosión en ambientes cerrados. Por esta razón, el uso del Helio es la opción más razonable ya que tiene una difusión mucho mayor que la del Nitrógeno.

Han sido desarrollados distintos tipos de interfase que cumplen más o menos con los requisitos expuestos pero que no continúan en uso por el desarrollo de otras más eficientes. Entre las primeras merecen mencionarse el separador de vidrio poroso y el diafragma de goma de silicona.

Hasta el presente se ha utilizado el principio de la diferencia en difusión entre el gas portador y la muestra. En este sentido, el efluente de la columna se hace pasar por un orificio muy pequeño situado en una lámina metálica fina. Separado de esta se encuentra una lámina igual con un orificio idéntico al primero y alineado con este. En el trayecto entre ambos orificios, las moléculas del gas portador difunden lateralmente. La difusión lateral es mínima en las moléculas de la muestra y la mayoría de ellas continúan en línea recta y atraviesan el segundo orificio. De esta forma se logra un enriquecimiento grande bajo condiciones apropiadas de operación (indicadas por el fabricante). Este mismo principio se aplica mucho actualmente en la interfase conocida como "jet separators" construidos de vidrio.

Ingeniosa también es la interfase constituida por un tubo capilar de pared fina y porosa, de Teflón el cual está rodeado por un "jacket" o cámara conectada a una bomba de vacío. Las moléculas de gas portador son forzadas por el vacío a atravesar las paredes del tubo capilar de Teflón mientras que las de la muestra continúan su viaje hacia la fuente de ionización, pues sus diámetros moleculares, son muy superiores a los poros del Teflón. Entre las ventajas del método se señalan su alto rendimiento y robustez pero tiene la desventaja de distorsionar las bandas cromatográficas y tener una temperatura de operación crítica. Con el mismo principio se ha usado el acero y la plata microporosas.

De modo análogo al acoplamiento HPLC-MS, en un sistema GC-MS se registra un cromatograma de corriente iónica total (TIC) contra el tiempo de retención. Puede también registrarse la corriente de un ión característico de cada componente de la muestra, contra el tiempo: este método se denomina SIM por sus siglas anglosajonas (selective ion monitoring)

El rango lineal de respuesta del sistema CG – MS es grande, superior a 10^4, mientras que el límite de detección depende del sistema que se use para captar la información (TIC, SIM). Pero aun con la modalidad menos sensible, este

acoplamiento permite una detección en el orden de las decenas de pg para una variedad grande de compuestos.

11.3.8. Amplificador

La señal producida por el detector de naturaleza eléctrica o transformable en ella, es amplificada mediante un accesorio adecuado llamado electrómetro, que permite variar dentro de amplios márgenes la señal que envía al registrador.

11.3.9. Registrador

Es un accesorio electromecánico que transforma el impulso eléctrico enviado por el electrómetro y lo convierte en impulso mecánico. Éste impulso mecánico se registra gráficamente originando el cromatograma. Como un complemento más costoso puede usarse un integrador. Éste equipo, electrónico o electromecánico, permite una cuantificación de la señal generada por el detector, ahorrando el trabajo que el analista debe realizar y que más tarde se explicará. En la actualidad, software especializados en computadoras de gran capacidad y rapidez permiten la captación, almacenamiento y procesamiento de toda la información que se origina en el detector. De esta forma el analista puede realizar automáticamente todas las operaciones que se hacían manualmente (la determinación de los tiempos de retención, el cálculo de las alturas y áreas de todos los picos del cromatograma), pero además hacer superponer cromatogramas correspondiente a análisis realizados en momentos y con muestras diferentes, restar la contribución del blanco de reactivos y blanco de muestras si fuera necesario entre otras operaciones.

La figura 11.18 muestra un cromatógrafo del año 2004 comercializado por la firma alemana Agilent Technologies.

Figura 11.18. Cromatógrafo gaseoso de la firma Agilent Technologies, 2004

11.4. TRATAMIENTO DE MUESTRAS EN CROMATOGRAFÍA DE GASES

Como ya se ha planteado la cromatografía de gases se aplica en la separación de compuestos volátiles o volatilizables, es decir se pueden separar y analizar sustancias gaseosas o en fase de vapor. Si las muestras se vaporizan dentro del instrumento, es más apropiado hablar de cromatografía en fase de vapor.

De forma general, a mayor peso molecular mayor punto de ebullición. Solo el 20 % de los compuestos orgánicos poseen presiones de vapor elevadas y pesos moleculares menores de 500 lo que los hace volátiles a las temperaturas de operación del cromatógrafo de gases y permite su análisis. Por otra parte, debe señalarse que muchas sustancias que en su forma monomérica tienen pesos moleculares bajos, pueden a través de puentes de hidrógeno intermoleculares, formar conglomerados de varias unidades, ya sea entre moléculas de la muestra, o entre ellas y el solvente, convirtiéndose en especies no volátiles y difíciles de analizar por cromatografía de gases.

Es por ello que en el análisis por cromatografía de gases es común someter la muestra a reacciones químicas previas con vista a obtener derivados con mejores propiedades cromatográficas. Las características generales del proceso de derivatización serán abordadas a continuación.

11.4.1. Derivatización

El objetivo general de la derivatización es, como ya se mencionó, mejorar las propiedades cromatográficas de los compuestos a separar por cromatografía de gases. Las razones para acometer este proceso pueden resumirse en los siguientes aspectos:

- En primer lugar la derivatización se realiza con vistas disminuir el punto de ebullición de los compuestos a separar mediante la disociación de los puentes de hidrógeno, es decir obtener derivados más volátiles que los compuestos nativos u obtener derivados volátiles a partir de compuestos que en su estado nativo no lo son.
- Disminuir la retención de los componentes de alta polaridad en la columna, previniendo así el coleo. Esto puede lograrse disminuyendo la polaridad de los analitos a separar o derivatizando los grupos silanol que se forman en la superficie de la sílice de la columna, con hexametildisilazano y/o clorotrimetilsilano.
- Mejorar la separación los componentes de la muestra, o propiciar la resolución de mezclas de enantiómeros.
- En el proceso de derivatización los analitos adquieren nuevas propiedades físicas y químicas, lo cual puede mejorar las propiedades de detección, ya sea con la producción de la señal o con el incremento de la sensibilidad de un detector determinado.

- Finalmente en la mayoría de las muestras los compuestos volátiles están presentes en concentraciones muy bajas y formando parte de una mezcla compleja. Todos aquellos compuestos que también están presentes en la matriz, en una concentración similar o mayor, pueden de una u otra forma interferir en la determinación. La conversión en sustancias derivadas con diferente estructura química permite su diferenciación del resto de los componentes de la matriz.

Las reacciones de derivatización más usadas en cromatografía de gases son las de esterificación, alquilación, acilación, silanización y acetilación.

Al valorar la factibilidad de derivatizar muestras para cromatografía gaseosa debe considerarse que:

- El tiempo para concluir una reacción depende de la presión, la reactividad de los agentes empleados, la naturaleza de los disolventes, y la estructura de los analitos que se quieren derivatizar.
- Es necesario conocer la pureza de los reactivos y disolventes, así como la estabilidad y volatilidad de los derivados.
- Es muy importante extremar precauciones durante los tratamientos térmicos, para disminuir o evitar pérdidas, especialmente si ya se obtuvo el derivado volátil.
- Mientras mayor sea la manipulación de la muestra, menor exactitud y precisión se tendrá en el análisis.
- Las sustancias de elevada polaridad, que tienen pares electrónicos no compartidos, y poseen hidrógenos activos de O-H, N-H o S-H, forman puentes de hidrógeno lo que dificulta no solo su vaporización sino también su separación en la columna cromatográfica. En este caso, la opción para suprimir estas asociaciones, es sustituir los hidrógenos activos por grupos alquilo, acilo o silano. Con el fin de incrementar la rapidez y el rendimiento de las reacciones es frecuente el uso de reactivos clorados, o mejor aún, fluorados
- La derivatización de compuestos que poseen más de un tipo de hidrógeno activo, como es el caso de los aminoácidos, puede implicar: la alquilación del carboxilo y la acetilación del grupo amino.
- Debe tenerse presente que las posiciones bencílicas y alílicas pueden experimentar rupturas térmicas. Si esto sucede, los picos del cromatograma son artefactos que se deben a la pirólisis. Aunque es poco probable, si hay presencia de oxígeno se puede producir combustión.
- Diversos compuestos como los fenoles, barbitúricos y esteroles, que en el pasado se tenían que derivatizar para analizarlos usando columnas empacadas, actualmente se determinan sin derivar empleando columnas capilares

- En el análisis de sustancias no volátiles, pero sí solubles, es mejor emplear métodos de HPLC

Un resumen de los agentes derivatizadores más empleados en cromatografía gaseosa se muestra en la tabla 11.7

Tabla 11.7.

Algunos reactivos derivatizadores y sus aplicaciones en cromatografía de gases.

Reactivos derivatizadores	**Aminas**	**Aminoácidos**	**Alcoholes**	**Fenoles**	**Azúcares**	**Ácidos**	**Esteroides**	**Vitaminas**
Anhídrido heptafluorobutírico	X	X	X	X			X	X
Anhídrido trifluoroacético	X	X	X	X				
Bis(trimetilsilil)acetamida	X	X	X	X	X	X	X	X
Bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida	X	X	X	X	X	X	X	X
Trifluoruro de boro metanol		X				X		
Clorotrimetilsilano	X	X		X	X	X	X	X
Hexametildisilazano	X	X	X	X	X		X	X
Triclorometilsilano					X		X	
N-trimetilsililacetamida	X	X	X	X	X	X	X	X

11.4.2. Técnicas empleadas para la extracción de componentes volátiles.

Las sustancias volátiles responsables del aroma y sabor de los alimentos generalmente están presentes en concentraciones trazas y en matrices complejas como son los propios alimentos. Por tanto, la preparación de la muestra y la preconcentración de los analitos se hacen necesarias para su posterior análisis.

Muchas son las técnicas de aislamiento utilizadas para la extracción de componentes volátiles en diferentes matrices, entre ellas pueden mencionarse: la extracción directa con disolvente, destilación-extracción con disolvente simultáneas, análisis del espacio de cabeza dinámico y la microextracción en fase sólida (SPME, del inglés *Solid Phase Micro Extraction*).

La técnica de extracción directa con disolvente, como su nombre lo indica consiste en extraer los analitos de interés con un disolvente adecuado y posterior concentración de los mismos para su inyección en el cromatógrafo.

La técnica de destilación-extracción simultáneas (DES) se fundamenta en el aislamiento de los compuestos mediante una destilación con vapor combinada con una extracción simultánea en un aparato apropiado.

La técnica de análisis del espacio de cabeza dinámico no utiliza disolventes y consiste en el arrastre con un gas inerte de purga y retención en una trampa con adsorbente desde la cual se introduce en el cromatógrafo de gases.

Las técnicas que requieren el uso de disolventes, como la extracción líquido-líquido y la destilación-extracción simultáneas son en ocasiones complicadas, consumidoras de disolventes de alta pureza y de tiempo. El empleo de la técnica del análisis del espacio de cabeza dinámico puede eliminar el uso de disolventes; sin embargo, requiere para la desorción térmica de los volátiles retenidos en la fase sólida que los inyectores de los cromatógrafos de gases sufran modificaciones extensas o la adición de costosos módulos de desorción.

De ahí que en la actualidad esté tomando mucho auge la técnica de microextracción en fase sólida, cuyas generalidades se describen a continuación.

11.4.2.1. Microextracción en fase sólida

La microextracción en fase sólida (SPME) para cromatografía de gases, desarrollada por Pawlizyn en 1990, es una técnica de preparación de la muestra, que presenta algunas diferencias respecto al procedimiento explicado en el epígrafe 9.5.2 para el caso de HPLC.

En primer lugar SPME para el análisis de compuestos volátiles se realiza sin el empleo de solventes, utilizando una fibra de cuarzo, colocada en la aguja de una jeringa especial y en este caso cubierta con una fase estacionaria apropiada, (lo que representa una segunda diferencia con respecto a HPLC, en el que la fase estacionaria está contenida en el interior de un capilar). El analito (o analitos) en la muestra es directamente extraído y concentrado en el recubrimiento de la fibra para su posterior inyección en el cromatógrafo. La figura 11.19 muestra un esquema de la jeringa con la fibra de vidrio recubierta de fase estacionaria.

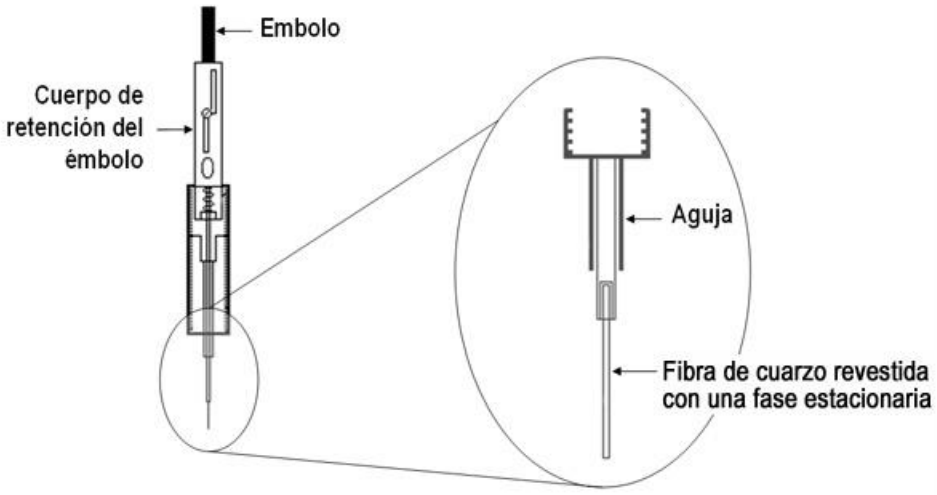


Figura 11.19. Jeringa con la fibra de vidrio recubierta de fase estacionaria

En la SPME para compuestos volátiles, pueden emplearse dos técnicas para la extracción de los analitos:

1. *Técnica de inmersión directa (DI-SPME)*, en la que la fibra es directamente sumergida en la muestra líquida haciendo contacto con el disolvente.
2. *Técnica de espacio de cabeza (HS-SPME)*, en la que la fibra es expuesta a la fase vapor sobre la muestra sin hacer contacto con el disolvente. Esto se logra colocando la fibra en el espacio de cabeza del recipiente que contiene la muestra. La muestra se calienta y los compuestos volátiles se adsorben o absorben a la fibra. Esta técnica prolonga la vida útil de la fibra porque la misma no está en contacto directo con la muestra.

La eficiencia de la extracción con cada técnica depende de las propiedades de los analitos y la matriz a analizar. En general, la DI-SPME es más sensitiva que la HS-SPME para analitos predominantemente presentes en un líquido. Sin embargo, la HS-SPME es adecuada para la extracción de analitos más volátiles en la mayoría de las muestras gaseosas, líquidas y sólidas.

La figura 11.20 ilustra de forma simplificada el proceso de extracción de volátiles mediante el análisis del espacio de cabeza por microextracción en fase sólida (HS-SPME) y posterior desorción en un cromatógrafo de gases.

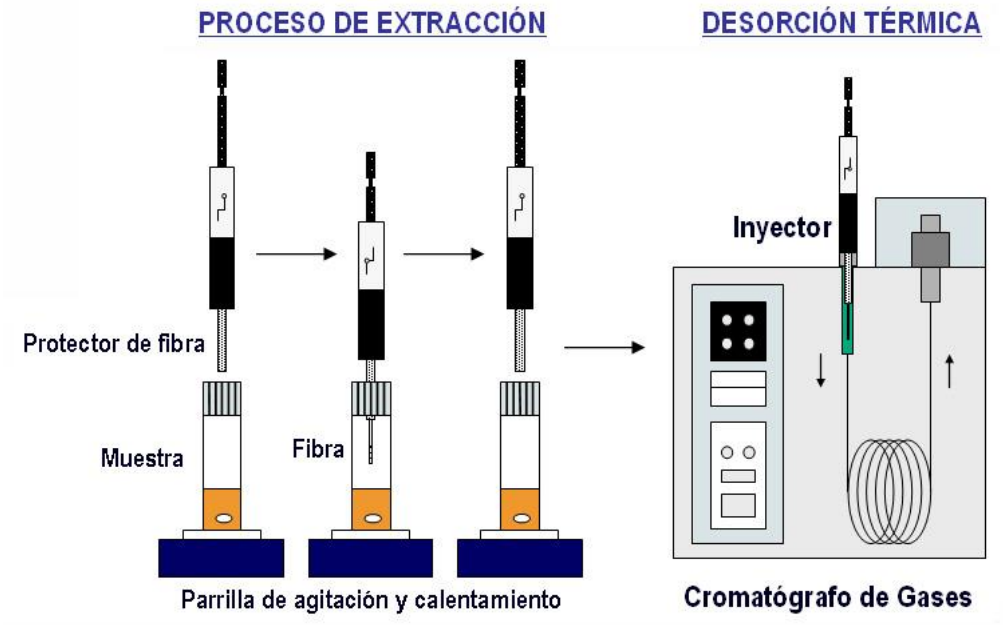


Figura 11.20. Proceso de extracción de volátiles mediante HS-SPME y posterior desorción térmica

Este método trae consigo un ahorro de tiempo de preparación y costos por no uso de disolventes, así como mejora los límites de detección. Esta técnica ha sido utilizada en combinación con la cromatografía de gases (GC) y la cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC-MS) y exitosamente aplicada a una amplia variedad de compuestos, particularmente para la extracción de compuestos orgánicos volátiles y semivolátiles del medio ambiente, biológicos y de los alimentos. La efectividad en la preconcentración del analito depende de varios parámetros entre ellos tipo de fibra, modo de extracción (DI-HPME o HS-

HPME) y desorción de los analitos en la fibra, tiempo y temperatura de extracción, presencia de sales, los cuales es necesario establecer previamente.

A. Tipo de fibra

De manera general se puede decir que distintos tipos de fases estacionarias son empleadas para la extracción de los analitos. La afinidad de la fibra por un analito depende del principio "lo símil disuelve a lo símil". En general, los compuestos volátiles requieren una capa de polímero gruesa y los semivolátiles una capa más fina. Además las fibras recubiertas con capas gruesas requieren un mayor tiempo parta lograr el equilibrio de extracción, pero aportan mayor sensibilidad debido a la mayor masa del analito que puede ser extraído.

La fibra apolar de polidimetilsiloxano (PDMS) es preferida para la extracción de sustancias no polares como lo son muchos compuestos volátiles del aroma; sin embargo, puede también usarse para compuestos más polares, particularmente después de optimizar las condiciones de operación.

La fibra más polar, poliacrilato (PA), es preferida para la extracción de analitos muy polares, particularmente fenoles y alcoholes. Fibras con mezclas de fases conteniendo copolímeros de divinilbenceno (DVB) o soporte de carbón activado (CAR:Carboxen) incrementan la capacidad de retención debido al efecto potencial de adsorción y distribución de la fase estacionaria. Las fibras de PDMS-DVB, CAR-DVB y Carbowax (CW: polietilenglicol)-DVB pueden ser utilizadas para la extracción de analitos polares y de bajo peso molecular. La tabla 11.8 relaciona los distintos tipos de fibras, así como sus principales características.

Tabla 11.8. *Características de las fibras de SPME disponibles (Supelco, 1999)*

Fase estacionaria	Polaridad	Grosor (µm)	Temperatura máxima (°C)
Polidimetilsiloxano (PDMS)	Apolar	100	280
		30	280
		70	340
Polidimetilsiloxano/divinilbenceno (PDMS/DVB)	Semipolar	65	270
		60	270
Poliacrilato (PA)	Polar	85	320
Carboxen/polidimetilsiloxano (CAR/PDMS)	Semipolar	75	320
		85	320
Carbowax/divinilbenceno (CW/DVB)	Polar	65	265
		70	265

B. Temperatura y tiempo de extracción

El tiempo de extracción es principalmente determinado por la velocidad de agitación y el coeficiente de partición del analito entre la fase de la fibra y la muestra. La agitación magnética acelera la transferencia de los analitos de la muestra al recubrimiento de la fibra. Aunque la SPME tiene una sensibilidad máxima en el punto de equilibrio, no es necesario alcanzar el equilibrio para mediciones exactas y precisas debido a la relación lineal existente entre la

cantidad de analito adsorbida (o absorbida) por el recubrimiento de la fibra y la concentración inicial en la muestra en condiciones de no-equilibrio. Es por ello que por lo general se acostumbra a fijar un tiempo de pre-extracción (en ocasiones mal llamado de equilibrio) para garantizar cierta estabilización de la concentración de los analitos en la fase vapor, así como de la temperatura del sistema.

Con el objetivo de incrementar la concentración de los analitos en la fase gaseosa durante la HS-SPME, la muestra es generalmente calentada. Un incremento de la temperatura de extracción causa un aumento de la velocidad de extracción y simultáneamente una disminución de la constante de distribución. Por tanto, debe ser utilizada una temperatura que conduzca a una sensibilidad y velocidad de extracción satisfactorias.

El tiempo de exposición es muy significativo. Un mayor tiempo favorece la ocupación de mayor cantidad de sitios en la fibra por las moléculas del analito, pero un tiempo prolongado cuando todos los sitios están cubiertos no afecta la eficiencia de la preconcentración y en ocasiones puede causar la desorción.

El tiempo y la temperatura de extracción son parámetros estrechamente relacionados el uno con el otro y un incremento en la temperatura proporciona un corto tiempo de exposición, lo cual contribuye a disminuir el tiempo de determinación.

C. Efecto de la adición de sal

La eficiencia de la extracción es también mejorada mediante la adición de alguna sal soluble en la muestra. El cloruro de sodio, bicarbonato de sodio, carbonato de sodio y sulfato de amonio son las sales más usadas para este propósito. En principio la sobresaturación de la muestra con sales es más efectiva para la extracción de los analitos por la fibra debido al efecto *salting-out*. Se debe tener en cuenta que este efecto depende de cada analito en particular y de la concentración de la sal en la muestra.

D. Desorción de los analitos

La desorción térmica eficiente de los analitos en el inyector del cromatógrafo es dependiente de la volatilidad del analito, grosor del recubrimiento de la fibra, profundidad del inyector, temperatura del inyector y el tiempo de exposición. Generalmente la temperatura de desorción óptima es aproximadamente igual al punto de ebullición del analito menos volátil. El tiempo de desorción depende de la temperatura del inyector y del flujo alrededor de la fibra. El control de este tiempo es importante si se quieren lograr resultados con altos recobrados y reproducibles.

11.5. Aplicaciones analíticas de la cromatografía de gases

Los procedimientos para realizar el análisis cualitativo y cuantitativo en cromatografía de gases son análogos a los empleados en HPLC y que fueron

explicados con detalle en el capítulo correspondiente. La tabla 11.9 muestra un resumen de los mismos.

Tabla 11.9.

Métodos de identificación y cuantificación empleados en HPLC y GC

Métodos de identificación	Métodos de cuantificación
1. Comparación de los tiempos de retención	1. Patrón externo
2. Anchura en la altura media	2. Curva de calibración
3. Enriquecimiento de pico	3. Patrón interno
4. Acoplamiento con espectrometría de masas	4. Normalización interna

Sin embargo en el caso de la cromatografía gaseosa se emplean con cierta frecuencia otros procedimientos de identificación los cuales se describen brevemente a continuación.

11.5.1. Uso de columnas de diferente polaridad

Cuando un problema de identificación se hace difícil por los métodos indicados da buenos resultados usar columnas de polaridades diferentes. Al variar la naturaleza químico-física de la columna es lógico esperar una interacción patrón FE diferente a la interacción muestra FE. Utilizando por lo menos dos columnas de diferente polaridad, los resultados que se obtienen son seguros. Son muy pocos los compuestos que se comportan igual bajo estas condiciones. El ensayo se hace más riguroso aún si además se incluye el factor temperatura. Esto es, si se trabaja con dos o más columnas a dos o más temperaturas diferentes.

11.5.2. Utilización de varios detectores

El uso de detectores selectivos facilita mucho la labor identificativa. Así por ejemplo, si un compuesto se detecta satisfactoriamente usando un detector de captura electrónica o uno termiónico, la identificación se facilita mucho ya que la relación de las respuestas para la muestra en los dos detectores tiene que ser la misma que la relación correspondiente del patrón. Si esto es así, se puede afirmar con una buena probabilidad de certidumbre que la muestra y patrón son el mismo compuesto.

Veamos un ejemplo: Un compuesto X se detecta por captura electrónica dando un pico de 4 *cm* de altura. Se analiza a continuación con un detector termoiónico, originando un pico de 10 *cm* de altura. El tr y el ancho del pico de la muestra en la semialtura coinciden bastante bien con el del methyl parathion, tanto en el detector de captura electrónica como en el termoiónico, obteniéndose alturas de picos de 3 y 7.5 *cm* respectivamente. La relación de las alturas de la muestra en los dos detectores es 10/4= 2.5 y la del patrón 7.5/3= 2.5. Con estos resultados la identificación queda concluida. El método descrito aunque sencillo y rápido tiene sus requisitos para poderlo aplicar. En efecto, se requiere que tanto el patrón como la muestra estén en el rango lineal de respuesta de ambos detectores, cosa que se puede determinar con facilidad haciendo algunas diluciones e inyecciones de ambos en los dos detectores. El segundo requisito es

también elemental, ha de inyectarse volúmenes iguales de muestra y patrón en ambos detectores. También la muestra y el patrón han de disolverse en el mismo solvente.

Otra posibilidad de usar dos detectores selectivos la tenemos cuando se presenta un compuesto organofosforado con un grupo P=S, cuyas propiedades son muy semejantes a las de un patrón organofosforado pero con grupo P=O. Si en este caso se usa un detector fotométrico de llama con filtro de fósforo, se obtiene respuestas para la muestra y el patrón, pero si el filtro usado es el de azufre, se obtendrá una sola respuesta (la muestra) excluyendo de inmediato la supuesta identidad.

11.5.3. Partición seguida de cromatografía gaseosa

Este método es muy útil y simple. Una cantidad de muestra y una cantidad semejante de patrón analítico se particiona por separado en dos solventes A y B poco miscibles entre sí. Se inyecta por separado volúmenes iguales del extracto de A, de la muestra y del patrón. Se hace lo mismo con el extracto B. Finalmente se calcula las constantes de reparto de la muestra y del patrón. La igualdad de esta constante en el ensayo descrito confirma la identidad de la muestra. Es requisito realizar el método expuesto de modo igual para la muestra y el patrón respecto a volúmenes de A y B, tiempo de agitación (extracción) y temperatura.

11.5.4. Transesterificacion

Es un método muy usado cuando los compuestos se cromatografían en forma de ésteres. Por lo general la esterificación en la mayoría de los métodos analíticos utiliza como agente el diazometano (o un precursor de este) o el sulfato de dimetilo. En ambos casos se origina el éster metílico del compuesto investigado, En este caso la confirmación se realiza transesterificando el éster, por ejemplo usando alcohol butílico. El procedimiento detallado es el siguiente. Teniendo en cuenta la sensibilidad de detección del método, se transfiere una cantidad suficiente de muestra a un tubo de ensayo de 25 *ml.* Se evapora el solvente y se añade 0,5 *ml* de n-butanol, se agita y a continuación se añade 0,5 *ml* de ácido sulfúrico concentrado, se tapa y calienta sobre baño de vapor durante 5 minutos agitando ocasionalmente, se enfría y quita la tapa y se añade 15 *ml* de agua agitando vigorosamente. Se añade 0,5 *ml* – 1,0 *ml* de isooctano (o n-Hexano). Se agita y deja reposar varios minutos. Se inyecta 5 μL del sobrenadante. El método se realiza también con los patrones. El tr del nuevo éster debe ser mayor e igual para muestra y patrón.

11.5.5. Desplazamiento de un pico por modificación química

Se ha desarrollado métodos específicos de confirmación de compuestos por cromatografía gaseosa que implican una modificación química de estos, los que ocasionan desaparición de un pico en algunos casos, mientras que en otros hay modificación de los tr, debido a alteraciones químicas de los analitos.

Son pocos los compuestos para los cuales hay procedimientos de este tipo, sin embargo debido a su elevada especificidad se le ha concedido cada vez mayor importancia. Consideremos el ejemplo siguiente, el cual ayudará a apreciar la importancia del método. Al analizar una muestra presentó dos picos cuyos tr y anchura en la semialtura coincidieron con los de los isómeros α y β endosulfan. Con vistas a confirmar la presencia del referido insecticida se transfiere a un balón de 100 *ml*; 600 *ng* de α y 560 *ng* de β endosulfan. Se evapora el solvente y se añade 10 *ml* de solución etanólica de KOH al 2 %. La mezcla se refluja 12 minutos. Al cabo de ese tiempo, se deja enfriar y se diluye con 100 *ml* de agua, extrayéndose con 20 *ml* de n-Hexano. El n-Hexano se seca por sulfato de sodio (cantidad mínima) y se concentra a sequedad diluyéndose a 1 *ml* con n-Hexano o acetato de etilo. De esta solución se inyecta 5 μL. En el nuevo cromatograma ha desaparecido el α y el β endosulfan, pero se presenta un pico con un tr que es aproximadamente la semisuma de los tr de los dos isómeros. El ensayo se realiza con la muestra en idénticas condiciones. La desaparición de los picos sospechosos de ser α y el β endosulfan y la aparición de un solo pico con tr intermedio entre los anteriores, confirman la presencia en el extracto del endosulfan.

Trabajo Independiente

1. *Consulte los apéndices C-6, C-7, C-8 y C-10, en los que aparece un resumen de la instrumentación empleada en cromatografía de gases, así como de los procedimientos de identificación y cuantificación utilizados en esta técnica, además de una comparación de las principales características de cromatografía de gases y HPLC.*
2. *Resuelva los ejercicios 15 y 16 que aparecen en el* ***Capítulo 14 / epígrafe 14.1. Ejercicios propuestos****.*
3. *Resuelva el ejercicio 2 que aparece en el* ***Capítulo 14 / epígrafe 14.2. Problemas integradores****.*
4. *Resuelva el ejercicio 5 que aparece en el* ***Capítulo 14 / epígrafe 14.3. Análisis de documentación científica****.*

BIBLIOGRAFÍA.

1. Ahuja S. (1992) Trace and Ultratrace Analysis by HPLC, Chemical Analysis. Vol. 115. Wiley. New york.
2. Alissandrakis, E.; Daferera, D.; Tarantilis, P. A; Polissiou, M. y Harizanis, P. (2003). C. Ultrasound-assisted extraction of volatile compounds from citrus flower and citrus honey. *Food Chem*., 82, 575-582.
3. Bouseta, A.; Collin, S. y Doufour, J-P. (1992). Characteristic aroma profiles of unifloral honeys obtained with a dynamic headspace GC-MS system. *J. Apic. Res*., 31, 96-109.

4. Carasek, E. y Pawliszyn, J. (2006). Screening of tropical fruit volatile compounds using solid-phase microextraction (SPME) fibers and internally cooled SPME fiber. *J. Agric. Food Chem.,* 54, 8688-8696.

5. Ceballos, L. Desarrollo de un método de microextracción en fase sólida para la determinación de compuestos volátiles en miel de abejas. (2007). Tesis en opción del título de Master en Ciencia y Tecnología de los Alimentos. Instituto de Farmacia y Alimentos. Universidad de La Habana. Cuba.

6. Cremer, F. y Prior, F. (1951). Z. Electrochem., 55, 66.

7. Dierksmeier, G. (2005). Métodos cromatográficos. Editorial Científico Técnica. Impreso por Impresol Ediciones Ltda. Bogotá, Colombia.

8. Fitzgerald, G.; James, K.J.; Macnamara, K. y Stack, M.A. (2000). Characterization of whiskeys using solid-phase microextraction with gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A,* 896, 351–359.

9. Gasco, L. (1969). Teoría y práctica de la cromatografía en fase gaseosa. Publicaciones Científicas de la Junta de Energía Nuclear. Madrid.

10. Harold M. Mc Nair H. M and J. M. Miller (1997) Basic Gas Chromatography Wiley, New York.

11. Harold M. Mc Nair, H. M and J. M. Miller (1997). Basic Gas Chromatography. Wiley. New York.

12. Hesse, G y col. (1941). Liebigs Ann. Chem., 546, 251.

13. Kataoka, H.; Lord, H. L. y Pawliszyn, J. (2000). Applications of solid-phase microextraction in food analysis. *J. Chromatogr. A,* 880, 35–62.

14. MALDI – TOF System Technical. Literature. HPG 2025 (1994). Hewlett Packard, Burlington. M. A. and San José. Ca.

15. Martin, A. y James, A. (1952). Biochem. J. 50, 679.

16. Mestres, M.; Marti, M. P.; Busto, O. y Guasch, J. (2000). Analysis of low-volatility organic sulphur compounds microextraction and gas chromatography. *J. Chromatogr. A,* 881, 583–590.

17. Niessen M. A. and J. Van der Greef (1992). Líquid chromatography mass spectrometry. Chromatographic Science Series 58 Marcel Dekker. New York.

18. Pawliszyn, J. (1997). *Solid Phase Microextraction: Theory and Practice*. Wiley-VCH, New York.

19. Pawliszyn, J. (1999). *Applications of Solid-Phase Microextraction*. Royal Society of Chemistry, Cambridge, 3-21.

20. Pawliszyn, J. y Arthur, C. L. (1990). Solid phase microextraction with termal desorption used fused silica optical fibers. *Anal. Chem.,* 62, 2145-246.

21. Pesticide Analytical Manual Vol. I – IV. Food and Drug Administration (FDA) 3er Edition (1994)

22. Pino, J. (2007). Characterization of rum using solid-phase microextraction with gas chromatography-mass spectometry. *Food Chem*., 104, 421-428.

23. Pino, J.; Martí, M. P.; Mestres, M.; Pérez, J.; Busto, O. y Guasch, J. (2002). Headspace solid-phase microextraction of higher fatty acid ethyl esters in white rum. *J. Chromatogr. A*, 954, 51-57.

24. Radovic, B. S.; Careri, M.; Mangia, A.; Musci, M.; Gerboles, M. y Anklam, E. (2001). Contribution of dynamic headspace GC-MS analysis of aroma compounds to authenticity testing of honey. *Food Chem*., 72, 511-520.

25. Sides, A.; Robards, K. y Helliwell, S. (2000). Developments in extraction techniques and their application to analysis of volatiles in foods. *Trends in Analytical Chemistry*, 19, 322-330.

26. Snow, N. H. y Slack, G. C. (2002). Head space analysis in modern chromatography. *Trends in Analytical Chemistry*, 21, 608-617.

27. Snyder L. R., J. J. Kirkland and J. L. Glajch (1997). Practical HPLC Method Development. Second Edition. John Wiley and Sons INC. New York, Chichester, Weinheim, Brisbane, Singapore, Toronto.

28. Sobdeva E. (2000). Basic Theory and use of GC-MS. FAO/IAEA Training and Reference Centre for Food and Pesticide Control. Publicado por International Atomic Energy Agency. Vienna, Austria.

29. Spanier, A. H.; Shahidi, F.; Parlimant, T. H.; Mussinan, C.; Ho, C.-T. y Tratras, E. (2002). Food flavors and chemistry: advances of the new millennium. *Food Res. Int*., 35, 898-899.

30. Supelco. Solid-phase microextraction fiber assemblies, 1999. [En línea]. Disponible en: www.sigmaaldrich.com. Fecha de consulta: Diciembre, 2008.

31. Wardencki, W.; Michulec, M. y Cury, J. (2004). A review of theoretical and practical aspects of solid-phase microextraction in food analysis. Int. J. *Food Sci. Technol*., 39, 703–717.

12 Cromatografía en capa delgada

La Cromatografía en Capa Delgada (CCD o TLC, del inglés Thin Layer Chromatography), conjuntamente con la cromatografía en columna abierta, fue una de las primeras técnicas cromatográficas empleadas en el laboratorio, no solo por su simplicidad sino también por su bajo costo y posibilidades de aplicación ilimitadas en la mayoría de los campos de la química analítica moderna.

Sin embargo, hasta la década de los '90 el desarrollo de la instrumentación para la aplicación de la cromatografía en capa delgada, se vio considerablemente empobrecido, no correspondiendo su importancia con el diseño de nuevos y más modernos instrumentos que fueran perfeccionando esta técnica y le permitiera incrementar su especificidad y especialmente su exactitud desde el punto de vista cuantitativo, siendo considerada por la mayoría de los analistas como un método puramente cualitativo, sin grandes pretensiones en cuanto a la cuantificación de los analitos a determinar.

Un factor que vino a contribuir grandemente a ello fue la aparición de los métodos de cromatografía gas-líquido (GLC, del inglés Gas Liquid Chromatography) y posteriormente la rápida evolución de la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, del inglés High Performance Liquid Chromatography) a partir de las experiencias y el desarrollo de la teoría de la cromatografía en columna, a la que rápidamente la mayoría de los analistas se aficionaron debido a la gran potencialidad que representaban, no solo desde el punto de vista cualitativo y cuantitativo sino también por las posibilidades de automatización y rapidez que poseían estas técnicas con respecto a la CCD.

Otra cuestión que también influenció fue el desarrollo de las técnicas acopladas GLC-EM y GLC-IR para la cromatografía gaseosa y la aparición de los detectores UV con arreglo de diodos para HPLC, lo que aumentó extraordinariamente la capacidad de identificación de los eluatos, ya no solamente por sus características de elución (Tr), sino también por sus características espectroscópicas.

Mientras esto sucedía la CCD quedaba rezagada y aunque las técnicas densitométricas ya se habían utilizado, las experiencias no eran muy alentadoras, especialmente cuando para la visualización del analito era necesario emplear reacciones coloreadas, debido a que el fondo de la placa interfería considerablemente en este tipo de determinaciones, haciéndolas imprecisas, razón por la cual esta técnica decayó considerablemente y solo se usaba en los casos donde se usaba la determinación en la zona ultravioleta. Aun en este caso, la calidad de las placas cromatográficas empleadas traía problemas, ya que al no

ser completamente plana la superficie de sílicagel, la línea base del Cromatograma era irregular y no se obtenían cuantificaciones adecuadas.

Es por eso que en comparación con los otros métodos ya mencionados, la CCD se convirtió en una especie de "cenicienta" y se utilizaba en muchos casos solo como un método auxiliar de comprobación de otros métodos analíticos.

Sin embargo, a partir de la década de los 80 y en especial a comienzos de los 90, la CCD resurgió de nuevo con una gran fuerza, y actualmente está compitiendo con las técnicas de cromatografía más avanzadas debido al gran desarrollo que ha experimentado el diseño y comercialización de toda una gama de equipos especializados que permiten realizar toda una serie de operaciones no concebibles con anterioridad, incluidas las técnicas de cuantificación y de acoplamiento como resultado del gran desarrollo alcanzado por la densitometría de scanning, la cual al ser acoplada a las técnicas actuales de computación, ha devenido en un poderoso instrumento para los propósitos anteriormente mencionados. Hoy en día la CCD puede rivalizar con HPLC y GLC, en muchos casos aun hasta en automatización.

Todo ello es también el resultado del desarrollo instrumental alcanzado en cada una de las etapas involucradas en el proceso cromatográfico que caracterizan la CCD. Así, la espectacular evolución de la CCD ha estado condicionada por el desarrollo tecnológico introducido en las placas cromatográficas los sistemas de aplicación de muestras, los tanques de desarrollo de las placas, los sistemas de revelado de las muestras y hasta los sistemas de documentación los que en algunos casos pueden competir con ventajas con HPLC y GLC.

12.1. GENERALIDADES

Como en el caso de cualquier tipo de cromatografía la separación de un compuesto por cromatografía en capa delgada tiene lugar entre dos fases, una de las cuales es móvil y la otra estacionaria. A diferencia de la cromatografía en columna en CCD la fase estacionaria está dispuesta en forma de una película fina sobre una superficie plana, mientras que la fase móvil asciende o desciende según el caso a través de la capa material que constituye la fase estacionaria.

En CCD la fase móvil es siempre líquida y la fase estacionaria puede ser un sólido con una alta superficie específica o un líquido retenido en la estructura de un sólido más o menos inerte. Así, la CCD puede ser líquido-sólido o líquido-líquido.

De forma general el procedimiento de trabajo en CCD atraviesa las siguientes etapas:

A. Preparación de la placa cromatográfica: El adsorbente se extiende sobre una lámina plana (de vidrio o aluminio generalmente) en forma de película fina formando antes una suspensión en agua u otro líquido apropiado. En general se usa un aglutinante para favorecer la adhesión del adsorbente a la placa soporte garantizando que la capa resultante tenga un espesor uniforme (figura 12.1).

Una vez extendida la suspensión se deja evaporar el exceso de agua para lo cual puede usarse un secado en estufa a temperaturas superiores a 100 ºC.

Figura 12.1. Disposición de la fase estacionaria en la placa

B. Aplicación de la muestra: La muestra o muestras a cromatografiar se aplican a 1.5 cm de uno de los bordes de la placa, conjuntamente con soluciones de patrones conocidos con vista su posterior identificación. La aplicación de las soluciones de la muestra y los patrones se realiza utilizando micropipetas, microjeringuillas o microcapilares, en la línea de origen, a la distancia del borde ya señalado. Cada aplicación debe estar separada lateralmente a una distancia suficiente de las aplicaciones contiguas para evitar que los componentes de la muestra y los patrones se superpongan (figura 12.2).

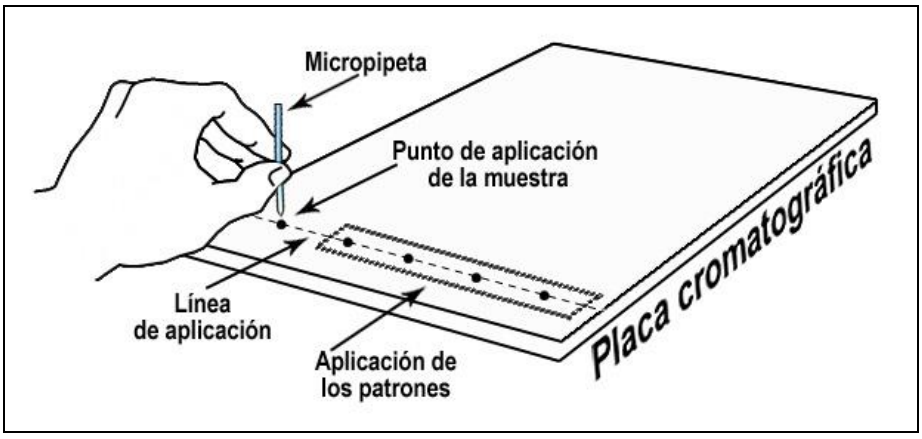


Figura 12.2.Aplicación de la muestra y los patrones

Una vez aplicada la muestra y los patrones debe dejarse evaporar el solvente de los puntos de aplicación lo cual puede realizarse con aire frío o con aire caliente en dependencia de la labilidad de los componentes.

C. Desarrollo del cromatograma: Consiste en hacer pasar la fase móvil (solvente de corrida) a través de la fase estacionaria. Para ello se coloca la placa en una cámara cerrada que contiene el solvente (o sistema de solventes) que se usará en el desarrollo del cromatograma. La profundidad del solvente no debe ser superior a 1 cm de manera que nunca los puntos de aplicación se sumerjan

en la fase móvil para evitar su disolución en ella. Una vez colocada la placa dentro de la cámara cromatográfica, el solvente asciende por capilaridad arrastrando a los solutos que comenzarán a separarse en función de las diferencias de afinidad por la fase móvil y la fase estacionaria. Aquellos más afines a la fase móvil se moverán con mayor velocidad y recorrerán una mayor distancia. La figura 12.3 muestra un esquema de una vista lateral de un desarrollo ascendente como el que se ha explicado.

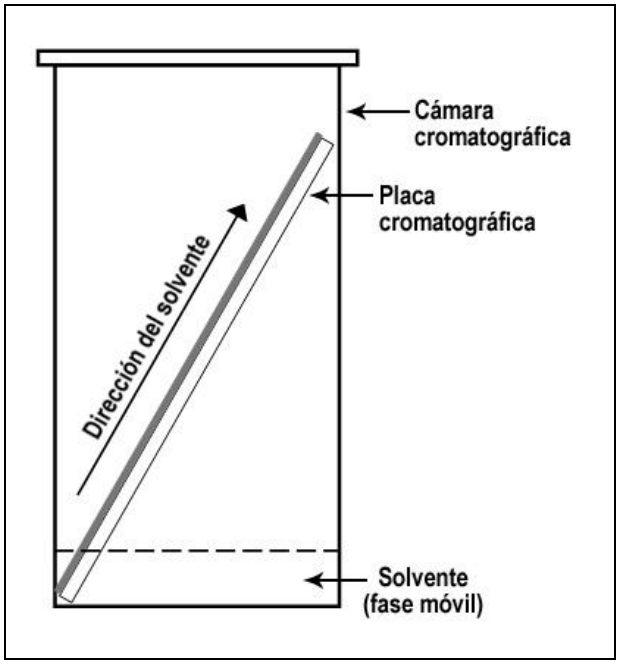


Figura 12.3. Desarrollo ascendente

La corrida cromatográfica se interrumpe cuando el frente del solvente haya alcanzado una distancia de 10 a 15 cm desde la línea de aplicación. En este instante se saca la placa de la cámara y se permite que el solvente se evapore, pudiendo usarse una corriente de aire caliente para acelerar el secado.

D. Revelado: La detección de los compuestos separados se realiza mediante métodos físicos o químicos que permitan visualizar la posición de los mismos en la superficie de la capa. Los componentes separados aparecen inmovilizados en la placa como manchas, tal y como se muestra en la figura 12.4.

La identificación se realiza de modo sencillo comparando las distancias de recorrido de los componentes de la muestra con las distancias de recorrido de los diferentes patrones aplicados. Es requisito de identidad entre un componente de la muestra y un patrón dado que ambos tengan iguales distancias de recorrido en la placa.

A continuación, se abordará con más detalle las características fundamentales de cada una de las etapas del proceso de separación por CCD.

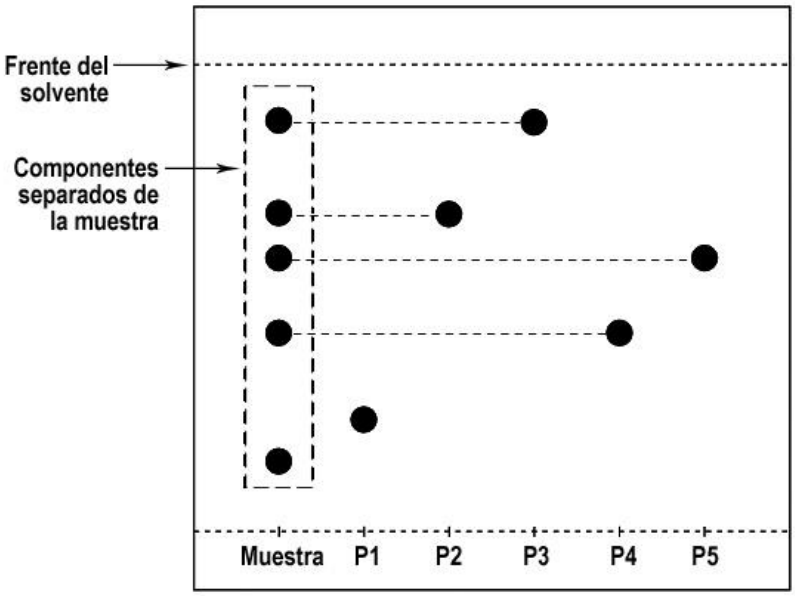


Figura 12.4. Cromatograma revelado de una muestra de 5 componentes. *Nótese que 4 de ellos han podido ser identificados, correspondiéndose con los patrones P2, P3, P4 y P5. Véase además que el componente de la muestra de mayor afinidad con la fase estacionaria (que mostró el menor recorrido) no pudo ser identificado en esta corrida puesto que su distancia de recorrido no coincide con la de ninguno de los patrones aplicados. Así mismo el patrón P1 no está presente en la muestra.*

12.2. NATURALEZA DEL PROCESO CROMATOGRÁFICO

En cromatografía en capa delgada se pueden poner de manifiesto los mecanismos de separación por adsorción, reparto e intercambio iónico, en función de la naturaleza de la fase estacionaria empleada. Los fundamentos de estos mecanismos ya fueron explicados en el epígrafe 7.7 del capítulo 7, por lo que no se abordarán nuevamente.

El proceso de separación en una placa cromatográfica, con independencia de la fase estacionaria utilizada, ocurre de la siguiente manera:

Una vez que la placa se introduce en la cámara cromatográfica (tomemos como ejemplo un desarrollo ascendente), el solvente o sistema de solventes transita por la misma a causa de fuerzas capilares. Cuando esta fase móvil llega al lugar de aplicación, los compuestos allí depositados son arrastrados con el solvente hacia arriba; sin embargo, tan pronto como esto ocurre los analitos desplazados se ponen en contacto con la fase estacionaria en otro punto de la placa situado más arriba estableciéndose un equilibrio del soluto entre ambas fases este proceso se repite de forma infinita en cada punto del recorrido de un compuesto a través de la capa y aquí entran en acción las diferencias de las propiedades físicas de los diferentes analitos, que a fin de cuentas dependen de su estructura. Los que tienen mayor afinidad por la fase estacionaria serán retenidos por esta, quedándose rezagados respecto a aquellos que tienen menor afinidad. Así, como consecuencia de la interacción soluto-FE y soluto-FM cada soluto recorrerá una distancia definida en la capa. Como en general las propiedades físico-químicas de

los distintos componentes de una mezcla no son las mismas, cada uno ocupará una posición diferente en su recorrido a través de la capa. El resultado es la resolución o separación de los componentes de la mezcla, cada uno de los cuales aparece en la placa como una mancha más o menos redonda, simétrica, casi siempre difusa hacia los bordes. Hay ocasiones en que estas manchas son alargadas en forma de elipse, horizontal o verticalmente y en casos extremos pueden presentarse prolongaciones, denominadas colas, las cuales son causadas fundamentalmente por sobrecarga del compuesto aplicado.

12.3. PLACAS CROMATOGRÁFICAS

Los soportes más empleados en los que se encuentra extendida la capa delgada con la fase estacionaria son el vidrio y el aluminio, aunque también se han empleado láminas plásticas. Las dimensiones de estas placas son variables, aunque las más comunes son de 20 x 20 cm, 20 x 10 cm y 20 x 5 cm. Se emplean una u otras en dependencia del número de aplicaciones que se deseen realizar.

Las fases estacionarias de mayor empleo son el gel de sílice o sílica gel (activada), el óxido de aluminio, el polvo de celulosa y el Kieselguhr para separaciones por adsorción, cuidando en todos los casos un bajo contenido de humedad para que no ocurra el fenómeno de reparto. En el caso de la cromatografía de partición, el gel de sílice no activado y la celulosa son las más empleadas, en tanto para intercambio iónico se emplean resinas intercambiadoras (aniónicas y catiónicas) similares a las utilizadas en cromatografía en columna.

Aunque la placa de silicagel sigue siendo el caballo de batalla en la mayoría de los laboratorios que aplican la CCD, ha habido una revolución en este sentido que ha permitido no solo aumentar la resolución del cromatograma, sino que también ha facilitado la aplicación de las muestras y ha aumentado la velocidad del análisis, cuestión esta que era objeto de crítica por parte de muchos especialistas en cromatografía.

Convencionalmente la disposición de la fase estacionaria sobre el soporte de vidrio o aluminio se realizaba artesanalmente en el laboratorio empleando unos dispositivos llamados tiradores y aunque esta técnica se empleó durante mucho tiempo (y aun se emplea en algunos casos), el grosor y la distribución del adsorbente no era todo lo uniforme que se hubiera deseado, por lo que en muchos casos los cromatogramas obtenidos adolecían de poca reproducibilidad y además de una pobre resolución.

El advenimiento de las placas precubiertas o las láminas de aluminio cubiertas con el adsorbente, ha permitido no solo mejorar la resolución del cromatograma, sino que también ha influido en la reproducibilidad de los resultados obtenidos.

Las placas precubiertas son placas de vidrio o aluminio producidas industrialmente con un alto grado de uniformidad de la fase estacionaria, tanto

en lo referente al grosor de la capa como al tamaño de partícula del material de la misma y son desechables, es decir se utilizan solo una vez para una cierta separación cromatográfica.

Con la aparición de la tecnología de la placa precubierta se hizo posible además la comercialización de toda una serie de variedades que incluyen no solo los tipos de cromatografía más convencionales como son las de reparto, adsorción e intercambio iónico, sino también la modalidad de fase ligada. Hoy en día es posible emplear placas de fase ligada (normal o reversa) empleando sistemas C-8, C-18, ciano, diol, amino, etc, al igual que en HPLC.

Gracias al desarrollo alcanzado en la comercialización de placas cromatográficas, muchas veces se prefiere elegir la CCD sobre la HPLC debido a la simplicidad en la preparación de las muestras.

Cuando los compuestos de interés se presentan incluidos en matrices muy complejas como sangre, orina, saliva y otros fluidos biológicos y se decide aplicar HPLC o GLC es necesario realizar una previa purificación de la muestra a fin de evitar que la columna cromatográfica se eche a perder rápidamente, lo que no es nada atractivo teniendo en cuenta el costo de las mismas.

En CCD esta etapa de purificación no es tan importante y se puede proceder a la aplicación de la muestra directamente si se quiere, debido a que siempre se utilizará una capa nueva en cada corrida cromatográfica, por lo que se partirá de un sistema cromatográfico completamente fresco, con lo que no es de temer la pérdida de resolución como sucede con las columnas de GLC o HPLC.

Otro elemento de vital interés es la aplicación de la muestra en la placa cromatográfica (figura 12.5) la cual resulta especialmente importante cuando se realiza de forma manual, siendo el objetivo a lograr, el obtener en la zona de aplicación un punto o una banda lo más estrecha y concentrada posible, a fin de obtener una mayor resolución al final de la corrida, por una menor difusión de la mancha. Para ello es necesario ser extremadamente cuidadoso y paciente y aun así no siempre se obtenían buenos resultados.

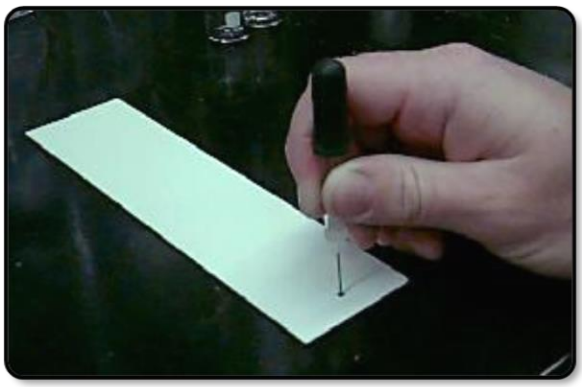


Figura 12.5.

Aplicación manual en forma de punto

Para resolver esta dificultad fueron creadas las placas con zonas de concentración en las cuales se ha definido una zona de aplicación y otra zona analítica. Con este tipo de placa, la aplicación de la muestra deja de ser tan exigente debido a que aunque no se logre un punto de aplicación lo suficientemente pequeño y concentrado, el efecto que se logra en la zona de aplicación es precisamente el de concentrar el punto o banda de aplicación de

muestra, la cual llega a la zona analítica en condiciones óptimas para desarrollar el cromatograma. Este tipo de placa puede ser especialmente adecuada para aquellos laboratorios donde los recursos no permiten la adquisición de instrumentos más adecuados que resuelvan esta problemática y se necesite realizar la separación de mezclas complejas.

El resurgimiento del interés en la cromatografía plana ha venido en gran medida aparejado con el desarrollo de las placas cromatográficas, lo que ha dado lugar a la cromatografía en capa delgada de alta resolución (HPTLC, del inglés High Performance Thin Layer Chromatography), también conocida como nanocromatografía. Este tipo de placa presenta diferencias considerables con la placa cromatográfica normalmente empleada, en una serie de características tales como el tamaño de partícula del adsorbente y la porosidad del mismo.

El adsorbente para HPTLC es producido de la manera más uniforme en cuanto al tamaño de partícula, teniendo una granulometría en cotas mucho más cerradas que el adsorbente normal, y un tamaño de poro mucho más pequeño. El grosor de este tipo de placa es también considerablemente menor encontrándose en el orden de los 100 μm, mientras que en la placa convencional es de alrededor de 250 μm para el tipo analítico.

Como resultado del menor tamaño de partícula, este tipo de placa es mucho más eficiente y permite obtener separaciones adecuadas con distancias de corrida de solo 3 a 5 cm, comparado con los 10-15 cm que normalmente se necesitan para el tipo convencional. Como consecuencia de lo anterior, los tiempos de corrida se reducen considerablemente lográndose reducciones de hasta 40% del tiempo empleado con las placas convencionales.

Ahora bien, debido al menor grosor de la placa, la capacidad de carga de la placa es menor lo que obliga a aplicar volúmenes de muestra considerablemente menores a fin de concentrar la muestra lo más posible en el punto de aplicación. Así, para obtener una óptima resolución, el tamaño de la mancha en el punto de aplicación no debe ser mayor a 2-3 mm de diámetro lo que implica que los volúmenes de aplicación han de estar en el rango de 0.1 a 0.2 μL. Lograr estos resultados con aplicaciones manuales resulta prácticamente imposible, por lo que se han tenido que diseñar toda una serie de aplicadores de muestra, de los cuales hablaremos más adelante.

El pequeño tamaño del punto de aplicación en HPTLC permite aplicar un gran número de muestras por placa (de 20 a 30 muestras por placa). Si se considera lo anterior y tomando como tiempo de corrida un total de 20 minutos puede decirse que la velocidad de análisis es de 1 muestra por minuto, con lo que se ejemplifica la capacidad que tiene esta técnica de competir con HPLC en términos de velocidad de análisis.

12.4. APLICACIÓN DE LA MUESTRA

Otro campo que ha experimentado un gran desarrollo es el de la aplicación de la muestra, punto neurálgico en el desarrollo exitoso de la cromatografía en capa delgada.

En sus inicios la aplicación se realizaba utilizando micropipetas, microjeringuillas y microcapilares. Las primeras permiten cargar volúmenes de 10 a 1000 μL, las microjeringuillas tienen una capacidad menor (5-50 μL) en tanto los microcapilares se fabrican generalmente de 1, 2, 3, 5 y 10 μL.

Los volúmenes de aplicación de la solución de muestra y patrones dependen de varios factores. En primer lugar, el volumen depende de la finalidad que se persigue, es decir si el trabajo es analítico o preparativo (en el segundo caso es obvio que se requiere aplicar mayores volúmenes) y por otra parte es importante considerar la concentración del analito. Así, por ejemplo, si se pretende analizar un componente que se encuentra en muy baja concentración en la muestra, cercana al límite de detección del método, es aconsejable aumentar el volumen de aplicación con vistas a garantizar su posterior detección.

De forma general los volúmenes de aplicación con objetivos analíticos están comprendidos entre 1 y 20 μL, obteniéndose una mayor repetibilidad cuando se aplican volúmenes pequeños por cuanto se evita la difusión radial de los solutos en el punto de aplicación.

Con fines preparativos se puede aplicar (sobre una placa de 20 x 20 cm y 0.5 mm de espesor), hasta 500 μL de solución. En estos casos la aplicación no se realiza en forma de puntos sino de bandas, tal y como se muestra en la figura 12.6.

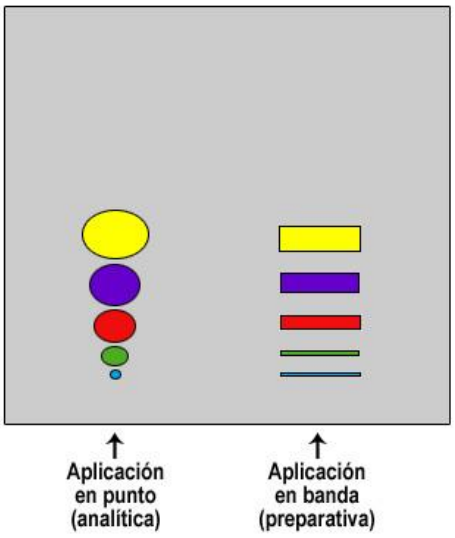


Figura 12.6. Aplicación en forma de punto y de banda

En el área de la aplicación de muestras se ha transitado desde los inyectores manuales (figura 12.7) empleando jeringuillas convencionales tipo HPLC, montadas en un sistema micrométrico, hasta los inyectores automáticos

acoplados a sistemas de computación, capaces de informar los estatus de operación y permitir aplicar cantidades extremadamente pequeñas de la muestra.

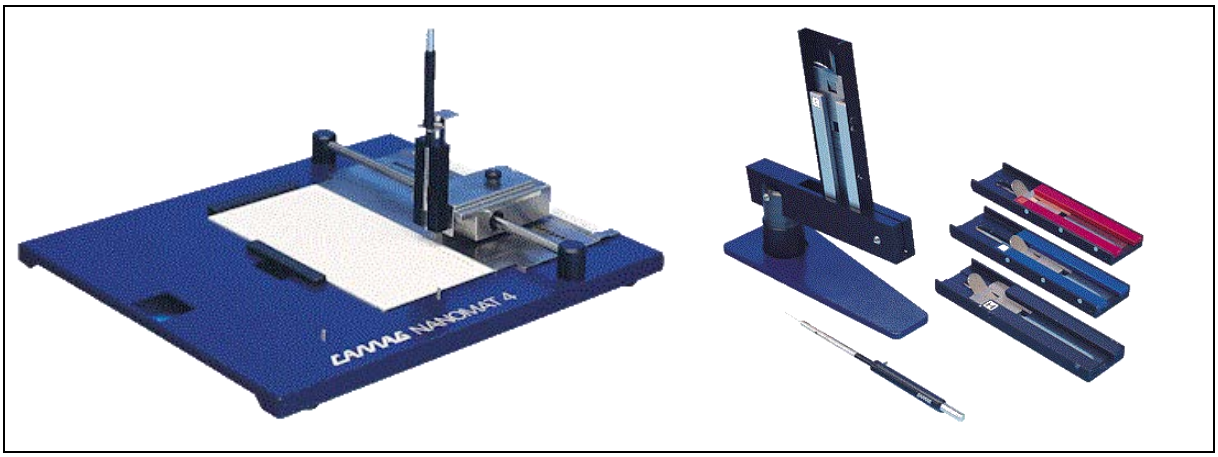


Figura 12.7. Diferentes tipos de aplicadores manuales

Una versión intermedia es el inyector semiautomático, el cual solo necesita que sea cargada la jeringuilla con el patrón o con la muestra problema.

Este pequeño instrumento de costo moderado, es capaz de calcular, según el tamaño de la placa, el número de pistas posibles de aplicación de la muestra, cuestión que es a veces un verdadero rompecabezas para el analista a la hora de optimizar el número de muestras por placa.

Programado adecuadamente, permite aplicar con una pequeñísima atención del analista, la muestra problema y los patrones de manera prácticamente insuperable, aun por manos expertas, ya que la aplicación se realiza mediante un spray que evita el contacto directo del dispositivo con la placa. Además, brinda la posibilidad de realizar el secado con aire o con nitrógeno, y siempre en frío, cuestiones importantes a la hora de manejar muestras fácilmente oxidables, siendo posible incluso adicionar un dispositivo que permite crear una cámara de gas inerte alrededor de la placa durante el proceso de aplicación.

Como característica adicional se puede agregar que la aplicación de la muestra puede realizarse en forma de puntos o en forma de bandas, lográndose una mejor resolución con esta última modalidad, pero que en numerosas oportunidades es despreciada debido a la dificultad que representa realizarla de forma manual con una pipeta.

El tamaño de la banda, así como el tiempo de secado es seleccionado por el analista de acuerdo a sus necesidades, teniendo en cuenta el carácter del solvente empleado para la disolución del analito. Finalmente se debe puntualizar que los aplicadores automáticos, liberan al analista del tedioso trabajo de realizar esta operación y le permite por tanto realizar otras tareas con lo que se consigue una mayor productividad.

Otros sistemas que han sido desarrollados son los relacionados con la nanocromatografía (HPTLC), donde se han diseñado equipos de aplicación

especiales para las pequeñas cantidades anteriormente discutidas y que realizan esta operación de forma semimanual empleando pequeños capilares de platino/iridio (figura 12.8).

Figura 12.8. Aplicador semiautomático Linomat 5 de la firma suiza CAMAG

Los sistemas de aplicación automáticos cubren las gamas de aplicaciones que van desde la cromatografía convencional hasta la nanocromatografía con un rango de volúmenes de aplicación entre los 10 nL y los 50 μL, en placas de hasta 20x20 cm.

Debido a que estos aplicadores están acoplados a sistemas de computación, permiten la operación de forma completamente automática y sin atención del operario una vez realizada la programación. Esto permite además almacenar en memoria la programación ejecutada y repetirla de forma completamente reproducible tantas veces como sea necesario.

12.5. TÉCNICAS DE DESARROLLO DE LOS CROMATOGRAMAS

Como ya se explicó el desarrollo del cromatograma es la etapa en la que se hace pasar la fase móvil a través de la fase estacionaria para lograr la separación de los solutos que componen la muestra. En este sentido existen varias técnicas de desarrollo; las más utilizadas se exponen a continuación:

A. Desarrollo ascendente.

Es el modo de operación más utilizado en el desarrollo del cromatograma, por la sencillez del equipo que requiere. Se coloca la placa dentro de una cámara o cubeta de cierre hermético, en cuyo fondo se ha colocado previamente la fase móvil la cual debe tener una profundidad máxima de 1 cm. La fase móvil asciende entonces por capilaridad a través de la placa y comienza el proceso de separación de los solutos de interés.

Es importante que la cubeta esté previamente saturada con los vapores del solvente, lo que se logra manteniendo el solvente dentro de la cámara alrededor de 12 horas antes de introducir la placa cromatográfica. En este sentido debe

señalarse que mientras menor volumen de solvente haya en la cámara, más rápido se alcanza el equilibrio líquido-vapor y más rápido es el proceso de saturación, consecuentemente la corrida cromatográfica ocurre en menor tiempo se evita que el solvente no se evapore en su ascenso al encontrarse con una atmósfera insaturada.

La figura 12.3, incluida en el epígrafe 12.1, muestra un esquema de esta técnica de desarrollo.

B. Desarrollo descendente

Esta modalidad requiere de una cubeta especial provista e un recipiente situado en su parte superior (figura 12.9). La placa se recuesta o fija, según el caso, al recipiente mencionado y mediante una banda de papel de filtro que abarque el ancho de la placa se establece un puente líquido entre la fase móvil y la placa. El solvente asciende por capilaridad a través del papel y llega al borde superior de la placa, a partir del cual comienza a descender a lo largo de la misma movido por dos fuerzas: la capilar y la gravitatoria.

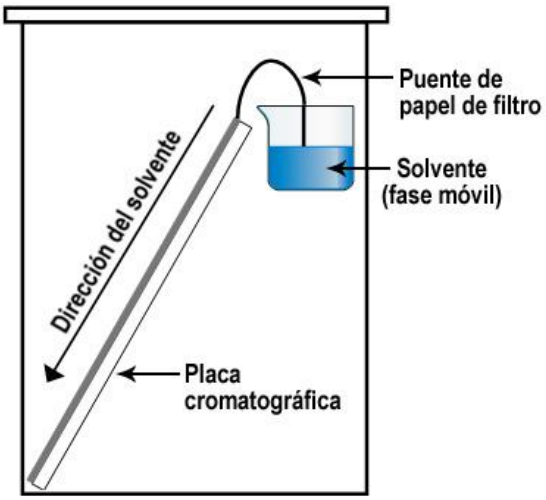


Figura 12.9. Desarrollo descendente

El desarrollo descendente es usualmente más rápido que el ascendente y se emplea usualmente cuando los compuestos a separar tienen muy poca distancia de recorrido desde el punto de aplicación. La corrida puede detenerse a una distancia mayor de 15 cm, cuando el frente del solvente está muy próximo al borde inferior de la placa.

C. Desarrollo horizontal

En su forma más sencilla, en esta técnica de desarrollo se coloca la placa horizontalmente dentro de una cámara y se hace llegar la fase móvil a uno de sus bordes mediante un puente de papel de filtro similar al explicado para el desarrollo descendente el cual asciende por capilaridad a través del papel y luego transita horizontalmente a lo largo de la fase estacionaria (figura 12.10)

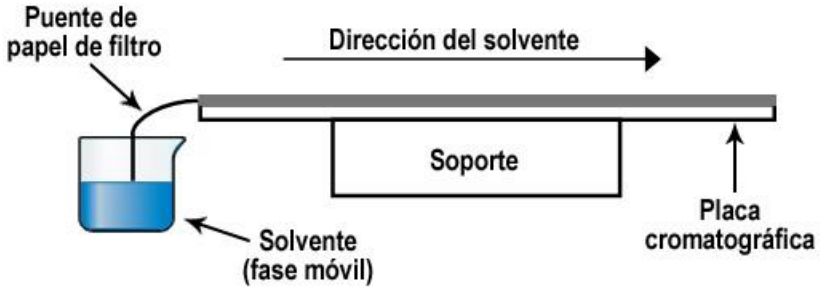


Figura 12.10. Desarrollo horizontal convencional

El desarrollo horizontal convencional, tal como se ha explicado n logró mejorar en sus inicios la separación frente a las técnicas ascendente y descendente. Sin embargo, en la actualidad ha tomado un enorme auge, aspecto este del que se comentará más adelante.

La clasificación de las técnicas de desarrollo arriba explicadas se fundamenta en la disposición de la placa cromatográfica y en la dirección que toma la fase móvil mientras fluye a través de la fase estacionaria.

Sin embargo, existen otros procedimientos adicionales que buscan mejorar la resolución del cromatograma. Dos de los más empleados son el desarrollo múltiple y el desarrollo bidimensional.

D. Desarrollo múltiple

La técnica de desarrollo múltiple consiste en realizar dos corridas cromatográficas sobre una misma placa. Así, por ejemplo, se realiza un primer desarrollo en un sistema de solventes hasta una altura determinada. La placa se seca y se introduce en otra cámara con otro solvente o sistema de solventes de polaridad diferente al primero, para realizar un segundo desarrollo, ahora hasta 15-20 cm del punto de aplicación. La elección del solvente para utilizar primero o después depende de cada problema específico y se determina por lo general empíricamente.

E. Desarrollo bidimensional

Esta técnica se aplica en los casos de separaciones difíciles, cuando no se logra una resolución adecuada de la mezcla aplicada. En este caso la mezcla se aplica en un solo punto en uno de los extremos de la placa; se realiza entonces un primer desarrollo en una dirección con un sistema de solventes hasta la altura convencional (10-15 cm). Posteriormente la placa se seca y se introduce en otro sistema de solventes con la particularidad que se ha girado 90º. Ahora los deficientemente separados con el primer sistema de solventes se moverán en dirección perpendicular al primer desarrollo, lográndose en muchas ocasiones buenas separaciones finales. La figura 12.11 esquematiza este procedimiento.

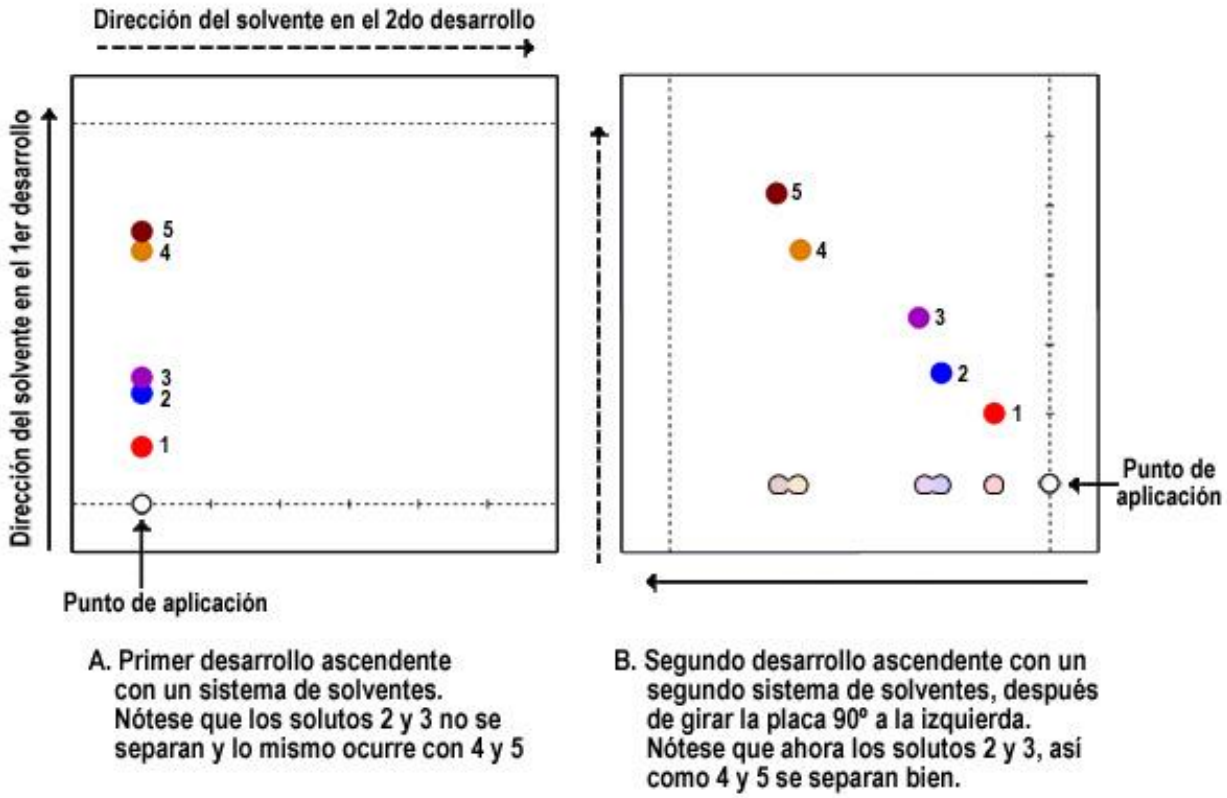


Figura 12.11. Desarrollo bidimensional

En lo referente a las técnicas de desarrollo, también se han producido avances espectaculares y existen hoy en día desde las cámaras usualmente empleadas que cubren desde los tanques cromatográficos convencionales hasta el tipo sándwich, hasta las cámaras completamente automatizadas.

Una cámara cromatográfica que aunque se puede considerar dentro del tipo de las convencionales se emplea hoy con cierta frecuencia es la conocida como Twin Through Chamber (figura 12.12), ya que una división de vidrio intermedia da la posibilidad de no solo emplear una menor cantidad de solvente sino que también, permite situar en la otra mitad un solvente distinto a fin de acondicionar la cámara con valores enriquecidos con un componente que puede estar presente o no en la fase móvil, como por ejemplo amoníaco.

Otro tipo de cámara a considerar es aquella en la cual se puede en una sola corrida analítica probar hasta 5 tipos distintos de solvente en una sola placa, con lo que se aligera bastante toda la serie de experimentos que muchas veces es necesario realizar antes de encontrar una composición adecuada de fase móvil. Al mismo tiempo otros parámetros tales como la humedad relativa y la influencia de reactivos volátiles pueden ser estudiados. Es evidente además el ahorro de placas que se obtiene.

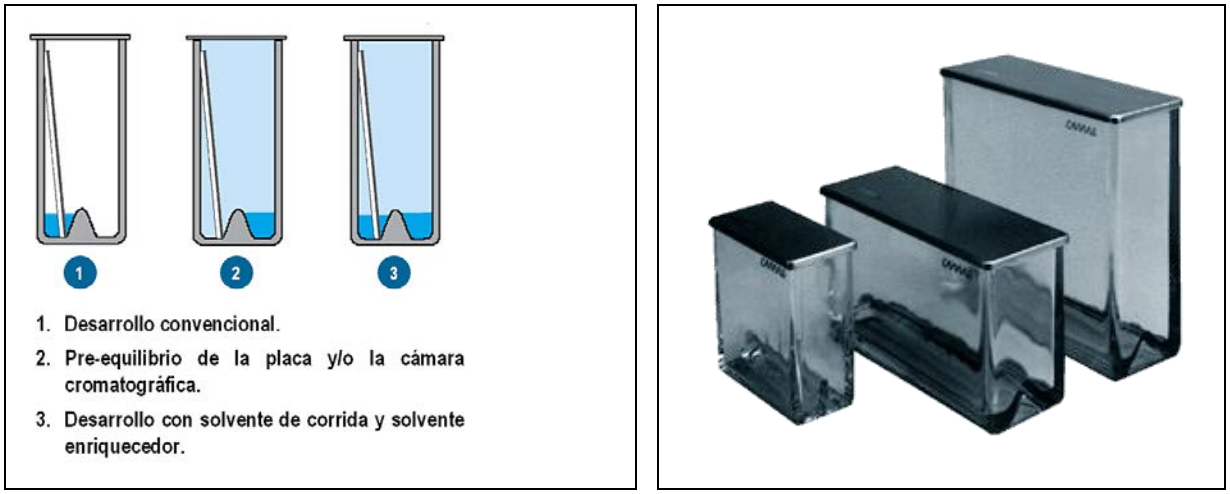


Figura 12.12.Twin Through Chamber

Para el desarrollo de la HPTLC se emplean hoy en día las llamadas cámaras horizontales (Figura 12.13.) en las cuales el solvente corre de forma horizontal como su nombre lo indica. Para ello se aplica una tira de papel que conecta la placa con el tanque de solvente. Con ello es posible por tanto como dijimos anteriormente aplicar muestras por ambos sentidos.

Como ejemplo puede decirse que aplicando las muestras con una separación de 5 mm entre ellas y dejando 15 mm libres a cada lado de la placa, es posible aplicar hasta 30 muestras en una placa de 10x10 cm.

Figura 12.13. Cámaras de desarrollo horizontal para HPTLC

Figura 12.14. Automatic Developing Chamber (ADC)

Hoy en día ya es posible el desarrollo del cromatograma de forma completamente automática. Existen en el mercado, cámaras de desarrollo capaces de preacondicionar la placa, realizar la corrida en forma de tanque o sándwich, controlar la distancia de migración y lo que es más, hasta secar la placa, con lo que el constante monitoreo de la misma deja de ser una preocupación del analista. Una vez que la corrida se ha terminado según las condiciones de programación dadas por el analista, la misma es secada con aire frío o caliente y permanece allí hasta que es extraída para su observación o el análisis cuantitativo (Figura 12.14.).

Quizás la variante más poderosa de separación es el conocido sistema AMD (Automatic Multiple Development) de esta misma firma, capaz de competir con la HPLC en cuanto a separación por gradiente se refiere (figura 12.15).

Entre sus características pueden nombrarse que debido a que tiene un efecto focusing en la banda cromatográfica permite obtener número de separación superior a 50, ofrece un método reproducible de elución de gradiente, con lo que componentes dentro de una amplia gama de polaridades pueden ser separados y permite que las distancias de migración de los componentes individuales sean independientes de las matrices donde se encuentran contenidos. Como ejemplos de aplicación pueden citarse la separación de pesticidas en agua potable, la separación de mezclas de fosfolípidos, sustancias anabólicas en humanos o alimentos, etc. Es por tanto posible realizar ahora técnicas de separación en capa delgada que no eran posibles de hacer hasta hace poco.

Figura 12.15. Sistema AMD

En la tabla 12.1 se presentan las principales ventajas del sistema HPTLC frente a la CCD convencional.

Tabla 12.1. Comparación entre CCD y HPTLC

Parámetro	CCD	HPTLC
Tamaño medio de partícula	10 - 12 µm	5 - 6 µm
Distribución del tamaño de partícula	5 – 20 µm	4 – 8 µm
Espesor de la capa	250 µm	50, 100, 200 µm
Altura de la placa	30 µm	12 µm
Volumen de muestra a aplicar	1 – 5 µL	0.1 – 0.5 µL
Diámetro del punto de aplicación	3 - 6 mm	1 - 1,5 mm
Diámetro de la mancha después del desarrollo	6 - 15 mm	2 - 5 mm
Distancia entre muestras	15 mm	5 mm
Número de muestras por placa	max. 12	max. 72
Distancia de migración	10 - 15 cm	3 - 5 cm
Tiempo de migración	20 - 200 min	3 - 20 min
Requerimientos de solvente	50 mL	4 - 8 mL

Parámetro	CCD	HPTLC
Límite de detección		
• Absorbancia	1 – 5 ng	100 – 500 pg
• Fluorescencia	50 – 100 pg	5 – 10 pg
Límite de determinación		
• Absorbancia	100 - 1000 ng	10 - 100 ng
• Fluorescencia	1 - 100 ng	100 pg - 10 ng

12.6. TÉCNICAS DE REVELADO

En la mayoría de los casos los compuestos separados por CCD no non coloreados por lo que, al culminar la corrida cromatográfica y el secado de la placa, es necesario visualizar la posición de los mismos en la placa cromatográfica. Para ello se emplean los llamados métodos de revelado que básicamente pueden ser de dos tipos: revelado químico y revelado físico.

12.6.1. Revelado físico

El revelado físico aprovecha alguna propiedad de los compuestos mediante la cual, a través de la interacción agente físico – analito, este último se hace visible.

El revelador físico más empleado es la radiación ultravioleta (UV) y la propiedad de los compuestos que se aprovecha es la fluorescencia. Una vez desarrollado el cromatograma y secado la placa, esta se expone a la radiación ultravioleta utilizando una lámpara UV adecuada y los compuestos separados fluourecen al interactuar con la radiación UV haciéndose visibles en forma de manchas sobre la placa. Obviamente este método posee la desventaja de ser aplicable, en un principio, solo a aquellas sustancias que son capaces de fluorescer.

Esta dificultad se resolvió con la aparición y comercialización de las placas fluorescentes, las cuales poseen un aditivo que fluoresce, generalmente a 254 y 336 nm. Al exponer la placa a la radiación UV, esta fluoresce con un color amarillo verdoso y en los lugares donde se encuentran los analitos no fluorescentes no se produce el fenómeno, visualizándose como manchas oscuras. Sin lugar a dudas el advenimiento de este tipo de placas amplió extraordinariamente las posibilidades de aplicación de este método físico de revelado.

12.6.2. Revelado químico

Se considera un revelador químico a cualquier reactivo que al reaccionar con el analito lo transforme en un derivado coloreado. Así, el revelado químico es simplemente un proceso de derivatización que se realiza "in situ" sobre la placa cromatográfica para visualizar los componentes separados que aparecen el gorma de manchas.

Las soluciones de los reveladores o reactivos cromogénicos se distribuyen sobre la capa mediante dos procedimientos:

- Por inmersión de la placa en el agente revelador, que constituye un método de poco empleo.
- Por pulverización neumática o atomización de la solución reveladora sobre la placa.

Es importante llamar la atención sobre la forma de aplicar la solución reveladora. La pulverización tiene que ser uniforme utilizando un pulverizador que entregue gotas muy finas. La distancia de colocación del pulverizador frente a la placa debe ser tal que la fuerza con que lleguen la gotitas no distorsione el cromatograma. En cada técnica particular se indica como dispersar el agente cromogénico y por lo general debe estarse aplicando solución reveladora hasta que la placa se torne traslúcida; se requiere además una etapa de tanteo en la cual se varía la cantidad de agente revelador, la distancia y la fuerza de la aspersión, antes de que se obtengan los mejores resultados. La figura 12.16 muestra un pulverizador típico, utilizado para la atomización de la solución reveladora.

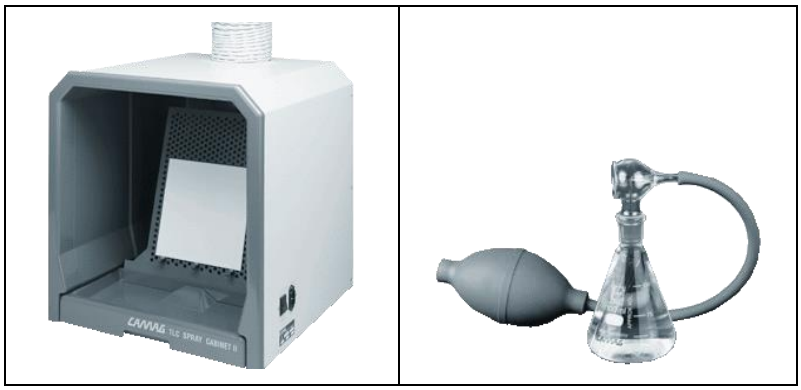


Figura 12.16. Cámara de pulverización y pulverizador para atomización

Debe señalarse que en algunas ocasiones se combina el revelado físico con el químico, debido a que existen reveladores químicos que requieren para su acción de agentes físicos como la radiación UV y el calor.

La tabla 12.2 muestra algunos reveladores químicos y sus condiciones de empleo.

Tabla 12.2. Algunos sistemas de revelado

Analito	Revelador	Tratamiento
Plaguicidas organoclorados	Solución de $AgNO_3$ + 2-fenoxietanol + peróxido de hidrógeno.	Exposición de la placa a radiación UV 254 nm después de haber evaporado el solvente.
Aminoácidos	Ninhidrina	Calentar la placa a 100ºC después de haber atomizado el revelador.

Analito	Revelador	Tratamiento
Esteroles y ácidos grasos	2,7-diclorofluoresceína	Exposición de la placa a radiación UV 254 nm después de haber evaporado el solvente
Ácido sórbico, benzoico, p-clorobenzoico, salicílico, p-hidroxibenzoico	Solución hidroalcohólica de dicromato de potasio 0.15 % + Solución saturada de ácido tiobarbitúrico 0,1% en Etanol 96%	Exposición de la placa a radiación UV 360 nm después de haber evaporado el solvente

12.7. ANÁLISIS CUALITATIVO

La identificación de las manchas en el cromatograma es el paso previo a su estimación cuantitativa. Sin embargo, esta etapa tiene gran importancia debido a que en muchos casos con la identificación del compuesto termina el análisis. En efecto, la CCD es una técnica muy fuerte de confirmación analítica y con tal finalidad se utiliza frecuentemente.

Cuando se poseen patrones de referencia de los compuestos que pueden presentarse en la muestra, la identificación resulta relativamente fácil. Sobre una misma placa se aplican muestras y los patrones de referencia de los analitos que se sospecha están presentes en la muestra. Luego de desarrollado y revelado el cromatograma se comparan las distancias de migración de los compuestos separados de la muestra con las distancias de migración de los patrones y en aquellos casos coincidentes hay razones para pensar que la identidad del compuesto se corresponde con la del patrón (ver figura 12.4 en el epígrafe 12.1).

Ahora bien, la comparación de estas distancias no se realiza solo visualmente, sino que se calcula un parámetro conocido como factor de retardo (*Rf*), definido como la relación entre la distancia recorrida por un compuesto entre la distancia recorrida por el solvente de corrida (fase móvil).

Tomemos por ejemplo el caso de una separación cromatográfica de una muestra constituida por 2 componentes A y B, la cual se ha cromatografiado con 2 patrones P1 y P2 (figura 12.17).

Es obvio que iguales valores de *Rf* para un patrón y cierto componente de la muestra indican la identidad del analito. Está claro también que el *Rf* toma valores entre 0 y 1.

Para el caso del componente B de la muestra el *Rf* se calcula:

$$Rf_B = \frac{distancia\ recorrida\ por\ B}{distancia\ recorrida\ por\ el\ solvente}$$

$$Rf_B = \frac{dB}{dS}$$

Y para el patrón de referencia P1 sería:

$$Rf_{P1} = \frac{dP1}{dS}$$

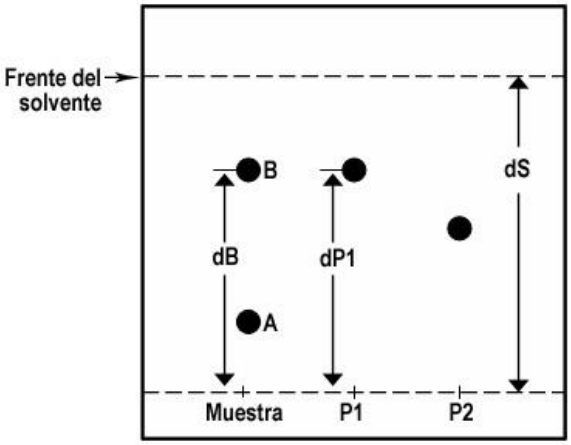


Figura 12.17. Cálculo del Rf

Pudiera pensarse que otra vía de identificación pudiera ser la comparación del *Rf* obtenido para el compuesto de interés con valores reportados en la literatura, sin embargo, este procedimiento es poco confiable debido a que los valores de Rf dependen de un grupo de factores, entre los que pueden citarse:

- El estado de saturación de la cámara cromatográfica.
- La naturaleza la fase estacionaria, pues aun de un mismo fabricante hay diferencias de un lote a otro a causa de las condiciones de fabricación.
- La temperatura a la cual se lleva a cabo el desarrollo.
- La actividad de la capa.
- La variación de la composición de la fase líquida, sobre todo cuando hay mucha diferencia entre los puntos de ebullición para el caso de mezclas de solventes.
- La técnica de aplicación (si esta se realizó manual o automáticamente, si se aplicó solo una vez o el punteo se realizó secando entre aplicaciones sucesivas).

Por las razones expuestas, resulta casi imposible reproducir exactamente las condiciones cromatográficas empleadas para la obtención de los valores de Rf reportados y por otra parte muchas veces todas las condiciones de separación no se conocen. Es por ello que se prefiere siempre aplicar patrones conjuntamente con la muestra, exactamente bajo las mismas condiciones con vista a eliminar los factores de variabilidad relacionados. Solo en los casos en que no se posean los patrones de referencia, se acude a la comparación con reportes de la literatura con la incertidumbre de que los resultados no serían del todo concluyentes.

12.8. ANÁLISIS CUANTITATIVO

Una razón por la cual la cromatografía plana fue relegada durante mucho tiempo por muchos analistas fue las dificultades inherentes a la cuantificación de los eluatos de interés con exactitud.

Sin embargo, es posible afirmar que hoy en día esas imprecisiones son cosas del pasado y la instrumentación desarrollada por la CCD en este momento es capaz de vencer estas dificultades de manera convincente.

Existen dos métodos fundamentales para realizar la cuantificación: la elución de los componentes de la placa y los métodos densitométricos.

12.8.1. Método de elución de los componentes

Uno de los métodos empleados para realizar este trabajo consistía en desarrollar el cromatograma y posterior a la visualización de las zonas de interés, raspar la zona de sílica correspondiente al componente que se deseaba cuantificar y trasvasarla a un recipiente donde hacía la medición directamente por técnicas espectroscópicas (o bien en la zona ultravioleta del espectro si el componente era capaz de absorber o se realiza una reacción de derivatización para obtener un compuesto coloreado que permitía realizar la determinación en la zona visible del espectro).

Esto traía toda una serie de inconveniente que iban desde la pérdida de muestra con el consiguiente bajo recobrado, hasta problemas de interferencias por el mismo adsorbente o por los reactivos usados en la reacción de color, por lo que era práctica obligatoria emplear un ensayo en blanco con la zona de la sílica a fin de obviar esta dificultad.

Era también importante realizar un estudio del sistema de extracción del eluato de la sílica a fin de garantizar un porcentaje de recuperación adecuado. No obstante, se necesitaba de pericia y una buena manipulación a fin de obtener resultados reproducibles y precisos, lo que no siempre se lograba.

Como una variante a esta modalidad es posible encontrar hoy en día instrumentos que permiten realizar esta operación de forma semiautomática sin tener que realizar la operación de raspado.

Estos dispositivos realizan la extracción del componente de interés mediante la elución en las zonas de separación de la fracción que se quiere de forma completamente automática sin tener que realizar el raspado de la placa, permitiendo la extracción de varias muestras al mismo tiempo.

Para ello se usa una pequeña boquilla de elución que se coloca exactamente en la zona donde se pretende realizar la operación después de la creación de una pequeña zona circular donde la sílica ha sido raspada mediante otro pequeño aditamento diseñado para este propósito. Ello permite que el solvente seleccionado para realizar esta operación entre de manera similar a como lo hace la fase móvil en la etapa de desarrollo del cromatograma y eluya así

cuantitativamente el componente, siendo recogido este solvente (conteniendo el componente) a un tubo o contenedor de otro tipo con el cual se puede realizar posteriormente las operaciones de medición o de derivatización necesarias.

Este instrumento puede ser conjugado para la separación cuantitativa o inclusive preparativa de todo tipo de compuestos susceptibles de ser separados mediante CCD y permite inclusive su obtención para su posterior introducción en un sistema de GLC o HPLC, en caso de que la separación no haya podido ser completada en la placa.

12.8.2. Métodos densitométricos

La solución más importante para el análisis cuantitativo por CCD, ha sido el desarrollo impetuoso que ha tenido la construcción de densitómetros cada vez más eficientes y poderosos.

Un densitómetro es un equipo capaz de medir una señal analítica de los componentes separados y los patrones directamente "in situ" sobre la placa cromatográfica. El resultado de esta medición es un cromatograma de señal vs. distancia de migración de cada uno de los componente de la muestra, en el cual, de forma análoga a la HPLC y a GLC, el área bajo la curva de cada pico es proporcional a la concentración (figura 12.18).

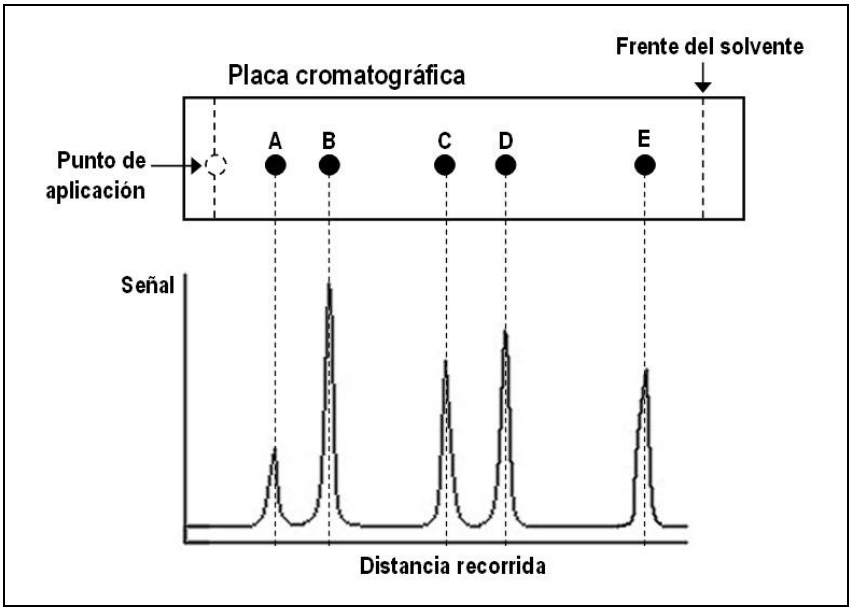


Figura 12.18. Placa cromatográfica de una muestra de cinco componentes (A, B, C, D y E) y cromatograma obtenido por barrido densitométrico.

La cuantificación de cualquiera de los componentes de la muestra se realiza con ayuda de una curva de calibración. Para ello se aplican en una capa nueva soluciones de un patrón de referencia correspondiente al componente que se desea cuantificar a concentraciones o masas crecientes y exactamente conocidas (por ejemplo 2, 4, 6 y 8 μg). Se realiza entonces la corrida cromatográfica bajo condiciones idénticas a las utilizadas para la muestra y la placa se coloca en el densitómetro para la lectura de la señal analítica de los patrones.

Se obtienen entonces un número de picos equivalentes al número de soluciones patrones aplicadas en la placa (cuatro en el ejemplo considerado) cuyas áreas bajo la curva aumentan en la medida en que aumenta la concentración de los patrones. El equipo es capaz de integrar estas áreas y como resultado se obtiene un juego de datos de concentración (o masa) de los patrones vs. área bajo la curva. Esta data se procesa por regresión lineal y se obtiene una ecuación del tipo

$$y = mx + a$$

donde ***"m"*** es la pendiente, ***"a"*** es el intercepto, ***"y"*** es el área bajo la curva del pico del componente de interés en el cromatograma de la muestra y ***"x"*** es la concentración o masa del componente de interés

La figura 12.19 muestra un esquema del proceso descrito.

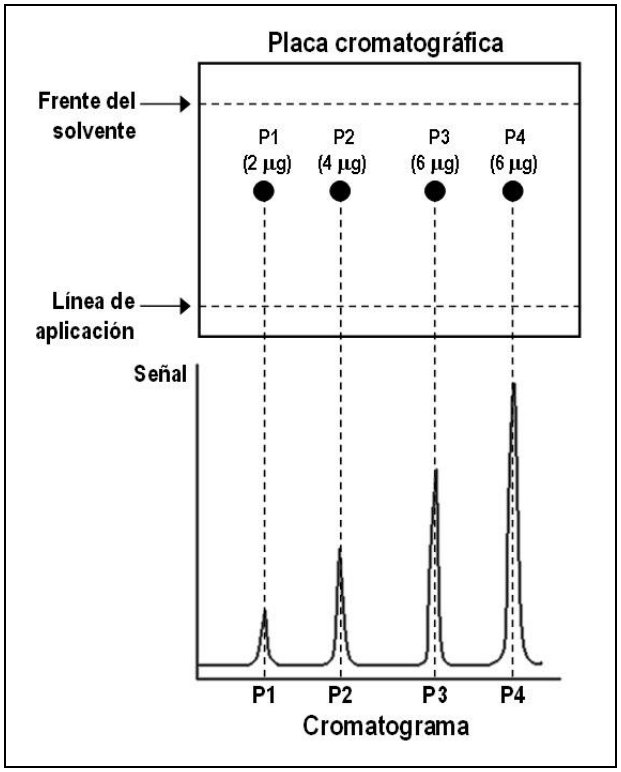


Figura 12.19. Curva de calibración y detección densitométrica.

Nótese que los valores de Rf de los diferentes patrones (P1, P2, P3 y P4) en la placa cromatográfica son iguales debido a que se trata del mismo componente. Véase además como en la medida en que aumenta la concentración de los patrones aumenta también el área bajo la curva de los picos obtenidos con el análisis densitométrico.

Los densitómetros actuales son capaces de leer con una gran precisión y exactitud no solo una placa de hasta 20x20 cm sino que también pueden leer tiras electroforéticas. Poseen un rango espectral útil desde 190 hasta 800 nm con lo cual superan en algunos casos los detectores UV/VIS de HPLC, y efectúan el barrido de la placa en forma de absorbancia, fluorescencia y reflectancia, lo cual puede ser seleccionado por el analista. Para ello usan 3 tipos de lámparas: las de Deuterio, en el rango espectral de 190 a 400 nm, las de Tungsteno-Halógeno en el rango de 400 a 800 nm y una lámpara de alta presión de mercurio en el rango de 254 a 578 nm.

Los fenómenos de absorbancia y fluorescencia ya fueron explicados en capítulos precedentes. En el caso de la reflectancia la señal obtenida es resultado de la

medición de la potencia de radiación reflejada por los analitos la cual es proporcional a su concentración. La medición de la fluorescencia tiene el inconveniente de estar restringida para aquellos componentes capaces de fluorescer, ya sea en su estado nativo o con ayuda de reacciones de derivatización, pero a su vez posee la ventaja del incremento considerable de la sensibilidad en la detección.

Entre otras características que han sido mejoradas se encuentran la construcción de monocromadores capaces de obtener hasta 1200 líneas/mm. Con este tipo de sistema, la cuantificación puede realizarse de forma confiable y exacta ya que la medición se realiza "in situ" y no es necesario realizar ninguna manipulación de la muestra.

Debe señalarse además que al igual que otras técnicas cromatográficas que cuentan hoy en día con sistemas que permiten obtener información estructural de las sustancias separadas (como son los detectores de espectrometría de masa para GLC y HPLC, así como arreglo de diodos para HPLC), los densitómetros actuales, al ser acoplados a sistemas de computación con software altamente sofisticados, hacen posible la ejecución de estas mismas operaciones, haciendo altamente eficiente el procedimiento de identificación sobre la base no solo de los valores de Rf sino también con la obtención de información espectral "in situ" de los componentes cromatografiados. Así, los densitómetros actuales permiten también monitorear el cromatograma a diferentes longitudes de onda con una sola corrida de forma similar a como lo hacen los detectores con arreglo de diodos en HPLC.

La figura 12.20 muestra un densitómetro acoplado a un sistema computarizado.

Figura 12.20. Densitómetro acoplado a un sistema de computación

Finalmente queremos discutir otro problema que estuvo directamente relacionado con el uso de los densitómetros, especialmente en el caso de detecciones donde se empleaba el revelado químico. Es conocido que el revelado químico en forma de spray con reactivos formadores de complejos coloreados, traía como consecuencia la distribución no uniforme del mismo, con su consiguiente acumulación en diferentes puntos de la placa, de forma

heterogénea. Esto conducía a que al aplicar las técnicas densitométricas se produjeran considerables desviaciones de la línea de base del cromatograma trayendo como resultado una apreciación errónea del área bajo la curva de los picos cromatográficos. Para resolver este problema, se ha desarrollado un sistema que permite esparcir de forma completamente homogénea y continua el reactivo revelador, por sumersión de la placa en el sistema cromogénico, por lo que la línea de base del cromatograma se presenta en condiciones óptimas.

Fotodocumentación

Una ventaja adicional con la que no cuenta el resto de las técnicas cromatográficas estudiadas (GLC y HPLC) es el sistema de fotodocumentación del cromatograma obtenido.

Actualmente existen aditamentos que permiten registrar fotográficamente la separación efectuada en la placa (Figura 12.21.), en excelentes fotografías a color, lo mismo a la luz ultravioleta que para aquellas detecciones con reveladores químicos, lo que permite crear un archivo de no solo el cromatograma visto por un densitómetro, sino también de la separación efectuada en la placa cromatográfica.

Figura 12.21. Sistema de fotodocumentación

Es innegable que la CCD, gracias al desarrollo innovativo de una poderosa instrumentación, está resurgiendo nuevamente en el campo del análisis cromatográfico como una técnica analítica sumamente poderosa que contribuye y contribuirá en los años próximos a ganar cada vez más adeptos y a reconquistar a los que en algún momento la abandonaron por métodos instrumentales más modernos.

Trabajo Independiente

1. *Consulte los apéndices C-4 y C-9, en los que aparece un resumen de los principios de funcionamiento de los métodos cromatográficos estudiados y de los procedimientos de identificación y cuantificación empleados en cromatografía en capa delgada.*
2. *Resuelva los ejercicios 17, 18 y 19 que aparecen en el* ***Capítulo 14 / epígrafe 14.1. Ejercicios propuestos****.*
3. *Resuelva los ejercicios 3 y 4 que aparecen en el* ***Capítulo 14 / epígrafe 14.2. Problemas integradores****.*

BIBLIOGRAFÍA.

1. Analíticos en Alimentaria. Métodos Oficiales de Análisis. Aceites y grasas. Ed. Panreac Química SA, 1999.
2. Analíticos en Alimentaria. Métodos Oficiales de Análisis. Productos derivados de la uva, aguardientes y sidra. Ed. Panreac Química SA, 1999.
3. Dierksmeier, G. (2005). Métodos cromatográficos. Editorial Científico Técnica. Impreso por Impresol Ediciones Ltda. Bogotá, Colombia.
4. McLeod, J. A. (1973). Instrumental Methods of Food Analysis. Elek Science. London.
5. Skoog, D; Holler, J; Crouch, S. (2008). Principios de análisis instrumental. 6ta ed. Cengage Learning Editores

13 Métodos potenciométricos

La potenciometría es una de las tantas técnicas abarcadas por la electroanalítica. Antes de referirnos a ella en detalle, es importante conocer en qué consiste efectivamente un método electroanalítico, que por otra parte, no presenta características unívocas sino que pueden subdividirse en diferentes sistemas o procedimientos.

Los métodos de rasgos electroanalíticos son procesos instrumentales empleados para distintos análisis. Asimismo, utilizan todas las propiedades electroquímicas con las que cuenta una determinada disolución para precisar debidamente la concentración que ésta posee de un analito. Las técnicas electroanalíticas más importantes son la electrogravimetría, la polarografía, la conductimetría, la amperometría, la voltametría, la cronoamperometría, la culombimetría, la cronoculombimetría y, por supuesto, el sistema aplicado por la potenciometría.

Toda la amplia gama de magnitudes electroquímicas que pueden ser empleadas o que pueden relacionarse con los métodos electroanalíticos también son muchas; pueden destacarse el grado de intensidad de la corriente eléctrica, el potencial de electricidad con el que se cuenta, la carga eléctrica, la resistencia eléctrica, la masa que se puede acumular en un determinado electrodo y, asimismo, el tiempo, que es un factor que hay que tener en cuenta para el caso de la cronoculombimetría y de la cronoamperometría.

Para realizar un esbozo de las principales técnicas electroanalíticas (dentro de las cuales se incluye la potenciometría, como ya hemos determinado), es preciso tener en cuenta las propiedades que se están midiendo. Por ello, los métodos básicos que deben listarse son: las técnicas voltamétricas, la conductimetría, la electrogravimetría y la culombimetría. Estas dos últimas opciones, son además conocidas como técnicas crono, justamente porque tienen la capacidad de medir la magnitud electroquímica en función directa con el tiempo. Pero, en general, es importante destacar que todas estas técnicas tienen en común su gran selectividad, así como también una adecuada sensibilidad. Como si todo esto fuera poco, el costo a la hora de ser aplicadas es infinitamente inferior al de otros métodos disponibles.

13.1. Principios generales de los métodos potenciométricos

Los métodos potenciométricos de análisis se basan en las medidas del potencial de celdas electroquímicas en ausencia de corrientes apreciables. Desde el comienzo del siglo XX, las técnicas potenciométricas se han utilizado para la detección de los puntos finales en los métodos volumétricos de análisis. De origen más reciente son los métodos en los que las concentraciones de los iones se obtienen directamente del potencial de un electrodo de membrana selectiva

de iones. Tales electrodos están relativamente libres de interferencias y proporcionan un medio rápido y conveniente para estimaciones cuantitativas de numerosos aniones y cationes importantes.

Todos los métodos potenciométricos se basan en el comportamiento de una pila electroquímica compuesta por dos electrodos sumergidos en la disolución electrolítica objeto de análisis.

Recordemos que la electroquímica es la parte de la química que trata de la relación entre las corrientes eléctricas y las reacciones químicas, y de la conversión de la energía química en eléctrica y viceversa. En un sentido más amplio, la electroquímica se ocupa del estudio de las reacciones químicas que producen efectos eléctricos y de los fenómenos químicos causados por la acción de las corrientes o tensiones.

La mayoría de los compuestos inorgánicos y algunos de los orgánicos se ionizan cuando se disuelven en agua u otros líquidos; es decir, sus moléculas se disocian en especies químicas cargadas positiva y negativamente que tienen la propiedad de conducir la corriente eléctrica, de ahí que se denominen electrolitos.

Cuando una barra metálica de un metal Me, se sumerge en una disolución que contiene sus propios iones o en agua pura, se produce una tendencia del metal a liberar iones positivos de la red metálica hacia la disolución y durante ese proceso, la barra metálica se va cargando negativamente debido al exceso de electrones que se acumulan por la liberación de los iones positivos. Ahora bien, llega un momento en que la barra cargada negativamente es capaz de atraer los iones positivos de la disolución, depositándose entonces el metal sobre la barra. Estos procesos ocurren reversiblemente hasta el establecimiento del equilibrio, que implica una transferencia de electrones a la que le corresponde una diferencia de potencial entre el metal y la disolución. Este potencial que se engendra en la interfase metal-disolución es imposible de medir directamente; es por eso que en la práctica se emplea un método indirecto basado en la comparación de dos electrodos.

En dependencia del analito que se desea determinar se escoge un tipo de electrodo, el cual responde al cambio de concentración del ion del analito en la disolución; de ahí que a este electrodo se le llame electrodo indicador. El valor del potencial del electrodo indicador se determina en comparación con otro electrodo no polarizable, cuyo potencial no varía, al cual se le denomina electrodo de referencia.

Resumiendo entonces, en todas las determinaciones potenciométricas hay un sistema electródico constituido por dos electrodos: un electrodo indicador que es el que mide la variación del potencial según varía la concentración del ion que se determina (analito) y otro electrodo de referencia, no polarizable y de potencial constante.

La figura 13.1 describe una celda típica para estudios potenciométricos.

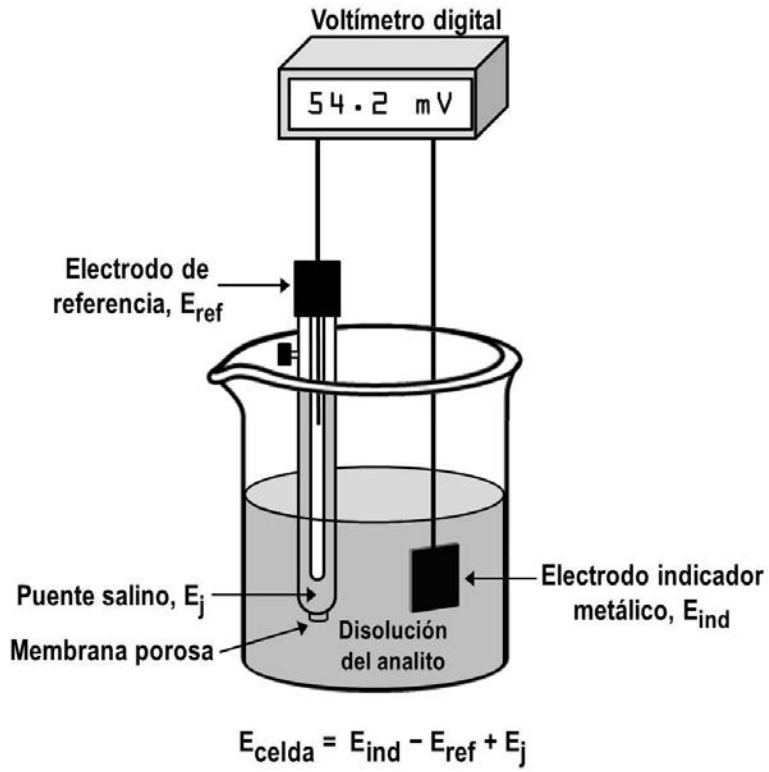


Figura 13.1. Celda para medidas potenciométricas.

El electrodo de referencia de la figura 13.1 es una semicelda cuyo potencial de electrodo E_{ref} se conoce con exactitud y es independiente de la concentración del analito u otros iones en la disolución de estudio. Aunque puede tratarse de un electrodo normal de hidrógeno, este se usa pocas veces ya que su empleo y mantenimiento es algo problemático. El electrodo indicador que se sumerge en la disolución del analito, adquiere un potencial E_{ind}, que depende de la concentración del analito. Muchos electrodos que se emplean en potenciometría son selectivos en sus respuestas.

El tercer componente en una celda potenciométrica es el puente salino, el cual impide que los componentes de la disolución del analito se mezclen con el electrodo de referencia. En la superficie de cada extremo del puente salino se desarrolla un potencial de unión líquida. Estos dos potenciales tienden a anularse mutuamente si las movilidades del catión y el anión son casi iguales. El cloruro de potasio es un electrolito para el puente salino casi ideal, puesto que las movilidades del K^+ y el Cl^- son prácticamente idénticas. Por tanto el potencial a lo largo del puente salino, se reduce a unos pocos milivolt. En muchos métodos electroanalíticos el potencial de unión es suficientemente pequeño para no tenerse en cuenta. Sin embargo en los, métodos potenciométricos, el potencial de unión y su incertidumbre pueden ser factores que afecten la exactitud y precisión de la medida.

El potencial de la celda que se acaba de describir, puede escribirse:

$E_{celda} = E_{ind} - E_{ref} + E_j$

La concentración del analito, está implícita en $E_{ind,}$ así pues, para la determinación potenciométrica debe medirse el potencial de celda, corregirlo respecto a los potenciales de referencia y de unión líquida y calcular la concentración del analito a partir del potencial del electrodo indicador. En un sentido estricto, el potencial de una celda galvánica se relaciona con la actividad del analito. La calibración adecuada del sistema de electrodos con disoluciones de concentración conocida, es la única forma de calcular la concentración del analito.

La figura 13.2 muestra un resumen de los tipos de electrodos de referencia e indicadores empleados en los métodos potenciométricos, cuyas características más importantes serán abordadas en los próximos epígrafes.

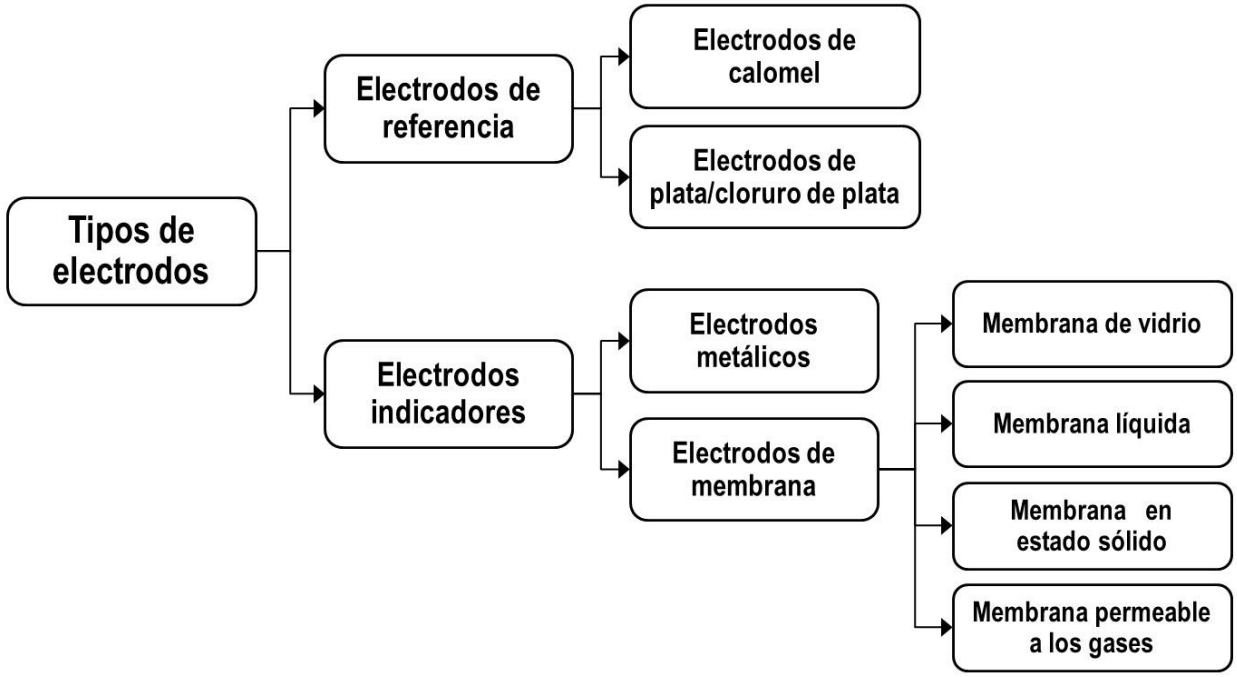


Figura 13.2. Tipos de electrodos usados en los métodos potenciométricos.

13.2. ELECTRODOS DE REFERENCIA

En la mayor parte de las aplicaciones electroanalíticas, es deseable que el potencial de semicelda de uno de los electrodos sea conocido, constante, y completamente insensible a la composición de la disolución en estudio. Un electrodo que se ajusta a esta descripción se llama electrodo de referencia. Junto con el electrodo de referencia se emplea un electrodo indicador o de trabajo, cuya respuesta depende de la concentración del analito.

El electrodo de referencia ideal, debe cumplir cuatro condiciones: (1) es reversible y obedece a la ecuación de Nernst, (2) presenta un potencial que es constante en el tiempo, (3) retoma a su potencial original después de haber estado sometido a corrientes pequeñas, y (4) presenta poca histéresis con ciclos

de temperatura. Aunque ningún electrodo de referencia satisface completamente estos ideales, varios están asombrosamente cerca.

13.2.1. Electrodos de Calomel

Los electrodos de referencia de Calomel se componen de mercurio en contacto con una solución saturada de cloruro de mercurio (I) que contiene también una concentración conocida de cloruro de potasio. A este electrodo se le denomina electrodo de Calomel saturado (ECS).

El electrodo de Calomel saturado (ECS) es muy utilizado por los químicos analíticos debido a la facilidad con que puede prepararse. Sin embargo, comparado con los otros electrodos de Calomel, su coeficiente de temperatura es significativamente mayor y otra desventaja es que cuando cambia la temperatura, el potencial sólo alcanza el nuevo valor lentamente, debido al tiempo requerido para restablecer el equilibrio de solubilidad del cloruro de potasio y de Calomel. El potencial del ECS a 25ºC es 0,2444 V.

Dos ECS ampliamente difundidos en el comercio se ilustran en la Figura 13.3. El cuerpo de cada electrodo consiste en un tubo externo de vidrio o de plástico que tiene de 5 a 15 cm de longitud y de 0,5 a 1,0 cm de diámetro. El tubo interno contiene una pasta de mercurio/cloruro de mercurio (I) en cloruro de potasio saturado; este tubo está en contacto con la disolución de cloruro de potasio saturada del tubo externo a través de una pequeña abertura.

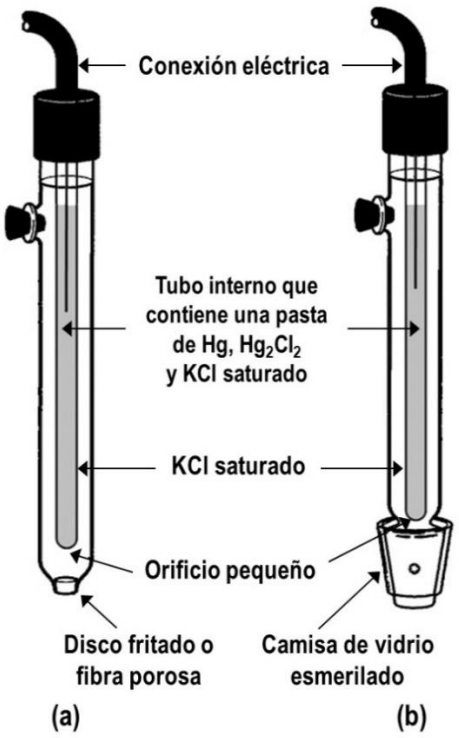


Figura 13.3. Electrodos de referencia de Calomel típicos

Para el electrodo (a), el contacto con el sistema del electrodo indicador se hace por medio de un tapón de porcelana fritada, una fibra porosa, o una pieza de

vidrio seco poroso sellada en el extremo del tubo externo. Este tipo de unión tiene una resistencia relativamente elevada (2000 a 3000 Ω) y una capacidad limitada de transportar la corriente; por otra parte, la contaminación de la disolución del analito debido a la salida de cloruro de potasio es mínima. El electrodo tipo camisa que se muestra en la figura 13.3b tiene una resistencia mucho menor pero tiende a derramar pequeñas cantidades de cloruro de potasio en la muestra. Antes de utilizarlo, se afloja y hace girar el collar de vidrio esmerilado, de forma que una gota o dos de disolución de KCl fluyan a través del agujero y mojen toda la superficie interior esmerilada. De esta manera se establece un mejor contacto eléctrico con la disolución del analito. El electrodo tipo camisa es particularmente útil para medidas en disoluciones no acuosas y en muestras pastosas, en sedimentos, en disoluciones viscosas y en suspensiones coloidales.

13.2.2. Electrodos de plata/cloruro de plata

El electrodo de referencia más ampliamente comercializado consiste en un electrodo de plata sumergido en una disolución de cloruro de potasio saturada con cloruro de plata.

Normalmente, este electrodo se prepara o bien con una disolución saturada de cloruro de potasio o con una 3,5 M. Los modelos comerciales de este electrodo son semejantes en apariencia externa y en forma a los dos electrodos de Calomel representados en la figura 13.2, sin embargo, en los electrodos de plata/cloruro de plata el tubo interno se reemplaza por un alambre de plata recubierto con una capa de cloruro de plata; este alambre está sumergido en una disolución de cloruro de potasio saturada con cloruro de plata. Para ambos tipos de electrodos se utilizan uniones similares.

Los electrodos de plata/cloruro de plata tienen la ventaja de que pueden utilizarse a temperaturas superiores a 60°C, mientras que los electrodos de Calomel no. Por otra parte, los iones mercurio (I) reaccionan con menos componentes de la muestra que los iones plata (que pueden, por ejemplo, reaccionar con las proteínas); tales reacciones pueden conducir a la obturación de la unión entre el electrodo y la disolución de analito.

13.3. ELECTRODOS INDICADORES

El electrodo indicador se define como el electrodo que adquiere un potencial cuya naturaleza y magnitud queda determinada por la concentración de sus propios iones en la disolución o por la relación de los iones de un elemento presente en dos estados de oxidación en la misma solución.

Un electrodo indicador ideal responde de forma rápida y reproducible a los cambios de actividad del ion analito. Aunque ningún electrodo indicador es absolutamente específico en su respuesta, actualmente se dispone de unos pocos que son marcadamente selectivos. Hay dos tipos de electrodos indicadores: metálicos y de membrana, los cuales serán abordados a continuación.

13.3.1. Electrodos indicadores metálicos

Se pueden distinguir cuatro tipos de electrodos indicadores metálicos: electrodos de primera clase, electrodos de segunda clase, electrodos de tercera clase y electrodos de oxidación reducción o redox.

A. Electrodos de primera clase

Están compuestos por un metal sumergido en una solución que contiene sus propios iones. Por ejemplo, un alambre de plata introducido en una solución de una sal soluble de plata. Es decir, que el sistema está formado por el metal, que es la forma reducida, y sus iones, que son la forma oxidada.

Generalmente los electrodos de primera clase son reversibles respecto al catión, o sea, su potencial es función de la concentración del catión. Estos electrodos se utilizan para la determinación del catión proveniente del metal con que está construido el electrodo. Así, los metales como Ag, Cu, Hg y Cd son adecuados para construir los electrodos de primera clase ya que presentan semireacciones reversibles con sus iones.

Sin embargo, los electrodos de primera clase no son muy utilizados en el análisis potenciométrico por varias razones. En primer lugar, no son muy selectivos y responden no sólo a sus propios cationes sino también a otros cationes más fácilmente reducibles. Por ejemplo; un electrodo de cobre no puede utilizarse para la determinación de iones Cu (ll) en presencia de iones plata (I), que también se reducen en la superficie del cobre. Además, muchos electrodos metálicos, tales como los de cinc y cadmio, sólo pueden utilizarse en disoluciones neutras o básicas porque se disuelven en presencia de ácidos. En tercer lugar, algunos metales se oxidan tan fácilmente que su uso queda restringido a disoluciones previamente desaireadas. Finalmente, ciertos metales duros, tales como hierro, cromo, cobalto y níquel, no proporcionan potenciales reproducibles.

B. Electrodos de segunda clase

Estos son los electrodos sensibles a los aniones. En este caso un alambre de plata recubierto con una de sus sales insolubles (AgCl, AgBr, AgI), indicará la concentración del anión, así como los iones de plata. Por ejemplo, el potencial de un electrodo de plata reflejará exactamente la concentración del ion Cl^-, Br^- o I^- en una solución saturada con AgCl, AgBr o AgI, de ahí que sea el más utilizado para la determinación de estos aniones.

Una manera adecuada de preparar un electrodo sensible a cloruros es poner un alambre de plata pura como ánodo en una celda electrolítica que contenga cloruro de potasio. El alambre quedará recubierto con un depósito adherido de haluro de plata, que rápidamente se equilibrará con la capa superficial de la disolución en la que este sumergido. Dado que la solubilidad del cloruro de plata es baja, un electrodo obtenido de esta manera puede utilizarse para numerosas medidas.

Un electrodo importante de segunda clase para medir la actividad del anión Y^{4-} del EDTA se basa en la respuesta de un electrodo de mercurio en presencia de una pequeña concentración del complejo estable del EDTA con Hg (II). Para emplear este electrodo, es necesario introducir al principio una pequeña concentración de HgY^{2-} en la disolución del analito. El complejo es tan estable (para el HgY^{2-}, Ke = 6,3 x 10^{21}) que su actividad permanece prácticamente constante en un amplio intervalo de actividades de Y^{4-}. Este electrodo es útil para establecer los puntos finales en las valoraciones con EDTA.

C. Electrodos de tercera clase

Los electrodos de tercera clase están compuestos por un metal en contacto con dos sales poco solubles. Por ejemplo: Ag en contacto con AgCl y $PbCl_2$, formando el sistema Pb^{2+} / $PbCl_2$, AgCl, Ag en el cual transcurre el siguiente proceso electrolítico:

$$2AgCl + Pb^{2+} + 2e^- \rightleftharpoons 2Ag\ (s) + PbCl$$

Durante el proceso electrolítico se efectúa la transformación de la sal menos soluble en otra de mayor solubilidad (Kps AgCl << Kps $PbCl_2$).

Una aplicación importante de los electrodos de tercera clase es la versión del electrodo Hg, HgY^{2-}; utilizado en las valoraciones complejométricas con EDTA, ya que su sal disódica (H_2Y^{2-}) forma un complejo muy estable con el catión del electrodo y con el metal que se valora (Me) componiendo el sistema siguiente:

$$Hg\ /\ HgY^{2-}\ .\ MeY^{2-}\ .\ Me^{2+}$$

Este electrodo da la medida de la $c(Y^{4-})$ del EDTA cuya respuesta se manifiesta en presencia de muy pequeñas concentraciones del complejo HgY^{2-}, el cual se añade al inicio de la valoración.

Como ejemplo puede citarse un electrodo de mercurio que se ha utilizado para la determinación del pCa de disoluciones que contienen calcio. Como en el ejemplo precedente, se introduce en la disolución una pequeña concentración del complejo de EDTA con Hg (II). Si, además, se introduce un pequeño volumen de una disolución que contiene el complejo del EDTA con el calcio, se establece un nuevo equilibrio y así, el electrodo de mercurio se ha transformado en un electrodo de tercera clase para el ion calcio.

D. Electrodos redox metálicos

Los electrodos de oxidación reducción están compuestos por un metal inerte o inatacable, sumergido en una solución que contiene iones en dos estados de oxidación. En este sistema, el metal inerte no participa en las semirreacciones y actúa solo como transportador de electrones entre las sustancias oxidante y reductora.

Generalmente estos electrodos están constituidos de platino o platino platinado u oro y se emplean en las valoraciones de oxidación reducción. El potencial que

desarrolla el electrodo depende únicamente del potencial del sistema redox de la solución en la que está sumergido el metal inerte.

Entre los electrodos redox se destacan los electrodos gaseosos. En este caso el electrodo gaseoso está compuesto por el metal inerte (Pt o Pt platinado) al cual se le suministra un gas con actividad electroquímica. Las moléculas del gas son adsorbidas en la superficie del metal, descomponiéndose en átomos y estos ya adsorbidos participan directamente en el proceso electródico.

Se debe resaltar, sin embargo, que los procesos de transferencia de electrones en los electrodos inertes no son con frecuencia reversibles. Como consecuencia, los electrodos inertes no responden de manera predecible a muchas delas semirreacciones encontradas en la tabla de potenciales de electrodo. Por ejemplo, un electrodo de platino sumergido en una solución de iones tiosulfato y tetrationato no presenta potenciales reproducibles, ya que el proceso de transferencia de electrones es lento y, por tanto, no reversible en la superficie del electrodo.

13.3.2. Electrodos indicadores de membrana

Se puede conseguir de fuentes comerciales una amplia variedad de electrodos de membrana que permiten la determinación rápida y selectiva de numerosos cationes y aniones por medidas potenciométricas directas. A menudo, los electrodos de membrana se denominan electrodos selectivos de iones debido a la gran selectividad de la mayor parte de estos dispositivos. También se refieren a ellos como electrodos de pIon debido a que su respuesta se registra generalmente como una función p, tal como pH, pCa, o pNO3.

Clasificación de las membranas

Los electrodos indicadores de membrana difieren entre sí, en la composición física o química de la membrana. El mecanismo general por el que se desarrolla en estos dispositivos un potencial selectivo a iones depende de la naturaleza de la membrana y es completamente diferente del origen del potencial en los electrodos indicadores metálicos. Mientras que el potencial de un electrodo metálico tiene su origen en la tendencia de una reacción de oxidación/reducción a producirse en la superficie del electrodo, en los electrodos de membrana, por el contrario, el potencial observado es un tipo de potencial de unión que se desarrolla en la membrana que separa la disolución del analito de la disolución de referencia.

Propiedades de las membranas selectivas de iones

Todas las membranas selectivas electrodos presentan propiedades comunes, que proporcionan la sensibilidad y la selectividad de los electrones de membrana hacia ciertos cationes y aniones. Estas propiedades son:

1. Mínima solubilidad. Una propiedad necesaria de un medio selectivo de iones es que su solubilidad en las disoluciones del analito (generalmente acuosas) se aproxime a cero. Así, muchas membranas están formadas por moléculas

grandes o agregados moleculares tales como los vidrios de sílice o resinas poliméricas. Los compuestos inorgánicos iónicos de baja solubilidad, tales como los haluros de plata, también se pueden convertir en membranas.

2. Conductividad eléctrica. Una membrana debe presentar algo de conductividad eléctrica aunque sea pequeña. Generalmente, esta conducción se debe a la migración en el interior de la membrana de iones con una sola carga.
3. Reactividad selectiva con el analito. La membrana o alguna de las especies contenida en la matriz de la membrana deben ser capaces de unirse selectivamente con los iones del analito. Se encuentran tres tipos de uniones: por intercambio jónico, por cristalización y por formación de complejos, siendo los dos primeros los más comunes.

Por la naturaleza de la membrana, estos electrodos selectivos se pueden clasificar en cuatro grupos:

- Electrodos de membrana de vidrio
- Electrodos de membrana líquida
- Electrodos de membrana en estado sólido
- Electrodos de membrana permeable a los gases

A. Electrodo membrana de vidrio

El electrodo de membrana de vidrio es el más importante electrodo indicador para la medida de la concentración hidriogeniónica (c H_3O^+), es decir el pH de innumerables sistemas. Su empleo es muy ventajoso porque además de estar sujeto a pocas de las interferencias que afectan a otros electrodos sensibles a la c H_3O^+, es muy versátil ya que puede usarse en soluciones ácidas, alcalinas, en presencia de reductores y oxidantes, sustancias volátiles, precipitados, proteínas, gases disueltos, sustancias viscosas y aun semisólidas.

El electrodo de vidrio para el pH es anterior en varias décadas a todos los demás electrodos de membrana. Desde principios de los años treinta, la manera más adecuada de determinar el pH ha sido midiendo la diferencia de potencial a través de una membrana de vidrio que separa la disolución del analito de una disolución de referencia de acidez fija. El fenómeno en que se basa esta medida fue identificado por primera vez por Cremer en 1906 e investigado sistemáticamente por Haber pocos años después. La generalización del uso del electrodo de vidrio para medidas de pH, sin embargo, se retrasó unas dos décadas hasta la invención del tubo de vacío que permitiría la adecuada medida de potenciales a través de membranas de vidrio que tienen resistencias iguales o superiores a 100 MΩ Los estudios sistemáticos de la sensibilidad de las membranas de vidrio frente al pH llevaron finalmente a finales de la década de los sesenta al desarrollo y comercialización de electrodos de membrana para dos docenas o más de iones tales como K^+, Na^+, Ca^{2+} F^- y NO_3^-.

La Figura 13.4 muestra una celda moderna característica para medir el pH. La celda consiste en un electrodo indicador de vidrio y un electrodo de referencia de plata/cloruro de plata o de Calomel saturado sumergidos en una disolución cuyo pH se va a determinar. El electrodo indicador consiste en una delgada membrana de vidrio sensible al pH sellada en el extremo de un tubo de vidrio de paredes gruesas o de plástico. El tubo contiene un pequeño volumen de ácido clorhídrico diluido saturado con cloruro de plata (la disolución interna en algunos electrodos es un tampón que contiene ion cloruro). En esta disolución un alambre de plata forma un electrodo de referencia de plata/cloruro de plata, que se conecta a una de las terminales de un dispositivo para medir el potencial. El electrodo de referencia se conecta a la otra terminal.

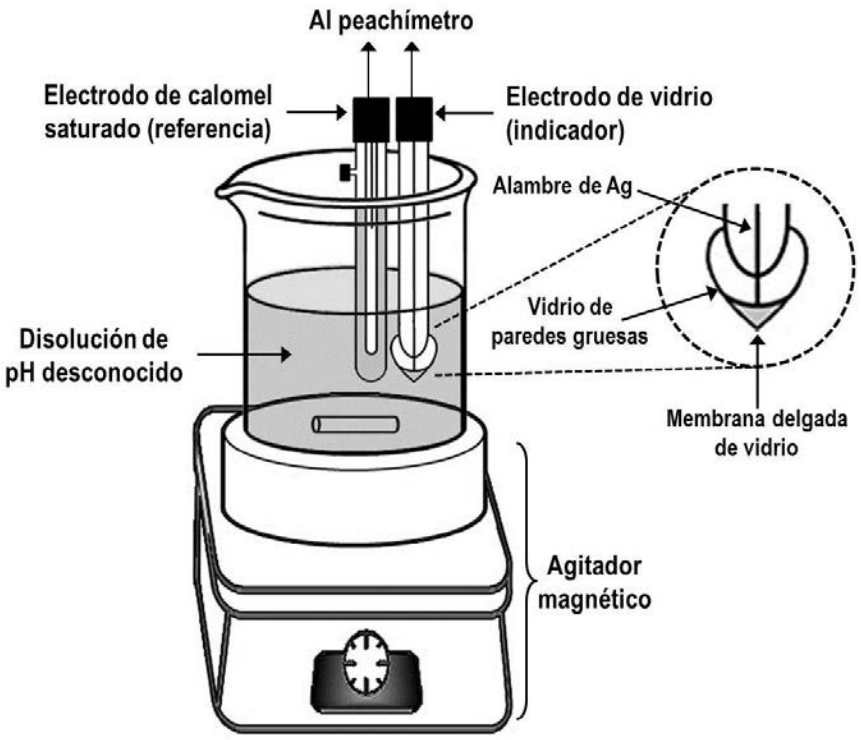


Figura 13.4. Sistema de electrodos típico para medir pH

Esta celda contiene dos electrodos de referencia: (1) el electrodo externo de plata/cloruro de plata y (2) el electrodo interno de plata cloruro de plata. Aunque el electrodo de referencia interno es una parte del electrodo de vidrio, no es el elemento sensible al pH. En cambio, es la delgada membrana de vidrio, en la base del electrodo, la que responde al pH.

B. Electrodos de membrana líquida

Este electrodo está compuesto por una delgada capa (membrana) de un líquido orgánico no miscible que separa la solución interna del electrodo (de concentración fija y conocida) de la solución del electrolito cuyo ion se quiere determinar. El potencial se engendra en la interfase entre la solución que se analiza y la membrana (líquido orgánico no miscible) que se une en forma selectiva al ion que se desea determinar. En general se emplean para la

determinación potenciométrica directa de algunos cationes polivalentes y ciertos aniones.

C. Electrodos de membrana en estado sólido

Estos electrones están formados por una membrana de un compuesto que tiene un catión capaz de atraer selectivamente a un anión. El más conocido es la membrana sólida de haluro de plata que es capaz de determinar selectivamente los iones Cl^-, Br^- o I^-.

D. Electrodos de membrana permeable a los gases

Este electrodo está compuesto por una membrana microporosa de un plástico hidrofóbico permeable a ciertos gases y que separa la solución interna, del electrolito objeto de análisis. La hidrofobicidad de la membrana conduce a que los poros permanezcan llenos de aire y no permitan pasar el agua de la disolución sino solo el gas que se desea determinar.

La figura 13.5 muestra algunos potenciómetros comerciales actuales.

(a) (b) (c)

Figura 13.5. Potenciómetros comerciales, (a) de mesa, (b) y (c) manuales

13.4. APLICACIONES DE LOS MÉTODOS POTENCIOMÉTRICOS

Atendiendo a la forma en que se realiza la medición potenciométrica, estos métodos se pueden clasificar en dos grandes grupos: métodos potenciométricos directos y métodos potenciométricos indirectos.

13.4.1. Métodos potenciométricos directos

La determinación de un ion o de una molécula mediante medida potenciométrica directa es rápida y sencilla, requiriendo sólo la comparación del potencial desarrollado por el electrodo indicador en la disolución problema con el potencial obtenido cuando se sumerge en una o más disoluciones patrón del analito. Debido a que la mayoría de los electrodos indicadores son selectivos, normalmente no se requieren etapas de separación previas. Además, las medidas potenciométricas directas son rápidas y se adaptan fácilmente al control automático y continuo de las actividades de los iones.

A pesar de estas importantes ventajas, el usuario de los métodos potenciométricos directos debe estar pendiente de las limitaciones inherentes a estas técnicas, dentro de las cuales pueden citarse las siguientes:

- La determinación requiere el uso de electrodos especiales selectivos.
- La determinación tiene que llevarse a cabo en soluciones donde se hayan removido las sustancias interferentes.
- El cálculo de la concentración del metal se hace complejo y bastante inexacto debido a la existencia de algunos factores como el potencial de la unión líquida, que aunque en la mayoría de los casos se desprecia, no deja de ser una limitación para la precisión que puede alcanzarse en la medición potenciométrica directa.

Aun cuando estas dificultades hacen limitado el empleo de los métodos potenciométricos directos, la mayor y más importante aplicación de esta técnica está en la medición directa del pH.

Medidas potenciométricas de pH con el electrodo de vidrio

El conocimiento de la concentración hidrogeniónica en una reacción química o en un proceso tecnológico es un parámetro indispensable para el control de dicha reacción o el control a lo largo de todo un proceso tecnológico, desde la materia prima hasta el producto final, redundando en beneficio de la calidad del producto final obtenido, mediante la determinación del pH en la línea de proceso, ya sea en forma puntual a través de análisis de laboratorio o en forma continua en la línea de proceso.

El electrodo de vidrio es indiscutiblemente el electrodo indicador más importante para el ion hidrógeno. Su uso es adecuado y está sujeto a pocas de las interferencias que afectan a otros electrodos sensibles al pH. Los electrodos de vidrio están disponibles a un costo relativamente bajo y se ofrecen en muchas formas y tamaños.

El electrodo de vidrio es una herramienta notablemente versátil para la medida de pH en muy diversas condiciones. El electrodo se puede utilizar sin interferencias en disoluciones que contienen oxidantes fuertes, reductores, gases y proteínas (en presencia de proteínas se utiliza, normalmente, un electrodo de

referencia de Calomel en vez de un electrodo de referencia de plata/cloruro de plata porque los iones plata reaccionan con las proteínas); se puede determinar el pH de fluidos viscosos o incluso semisólidos. Se puede disponer de electrodos para aplicaciones especiales. Entre estos se encuentran pequeños electrodos para medidas de pH en una gota (o menos) de disolución o en una cavidad de un diente, microelectrodos que permiten la medida del pH dentro de una célula viva, sistemas para su inserción en una corriente de un líquido que fluye para obtener el control continuo del pH, un pequeño electrodo que puede tragarse para indicar la acidez del contenido del estómago (el electrodo de referencia se mantiene en la boca), y electrodos combinados que contienen tanto el electrodo indicador como el de referencia en una sonda única.

La figura 13.6 muestra algunos peachímetros de mesa y manuales con electrodos integrados.

(a) (b) (c)

Figura 13.6. Peachímetros comerciales, (a) de mesa, (b) y (c) manuales.

13.4.2. Métodos potenciométricos indirectos (valoraciones potenciométricas)

El método potenciométrico indirecto comprende todos los tipos de *valoraciones potenciométricas*, que en su esencia son las mismas que fueron estudiadas en el análisis químico clásico[1]. La diferencia estriba en que en el análisis clásico se emplean indicadores para detectar el punto final de la valoración mientras que en las valoraciones potenciométricas, el potencial de un electrodo indicador adecuado se emplea con comodidad para establecer el punto de equivalencia.

Una valoración potenciométrica proporciona una información diferente que la de una medida potenciométrica directa. Por ejemplo, la medida directa de disoluciones de ácido acético 0,100 M y ácido clorhídrico 0,100 M con un electrodo sensible al pH da valores de pH bastantes diferentes debido a que el

[1] Para obtener información sobre los métodos volumétricos clásicos véase: *Zumbado, H. Análisis Químico de los Alimentos. Métodos clásicos. Ed. Felix Varela. La Habana, Cuba, 2006.*

primero sólo está parcialmente disociado. Por otro lado, las valoraciones potenciométricas de volúmenes iguales de los dos ácidos requieren la misma cantidad de base patrón para su neutralización.

El punto final potenciométrico es ampliamente aplicable y proporciona datos inherentemente más exactos que el método correspondiente que utiliza indicadores. Es particularmente útil para la valoración de disoluciones coloreadas o turbias y para detectar la presencia de especies insospechadas en una disolución. Desafortunadamente, emplea más tiempo que una valoración que utilice un indicador a no ser que se utilice un valorador automático.

La figura 13.7 muestra un aparato típico para realizar una valoración potenciométrica. Por lo general la valoración consiste en el registro de un potencial de celda (o una lectura de pH) después de cada agregado de solución la valorante contenida en la bureta. Al comienzo de la valoración se agregan se adicionan porciones grandes del valorante y a medida que se aproxima el punto final (indicado por mayores cambios de potencial en cada agregado) los volúmenes adicionados se hacen más pequeños.

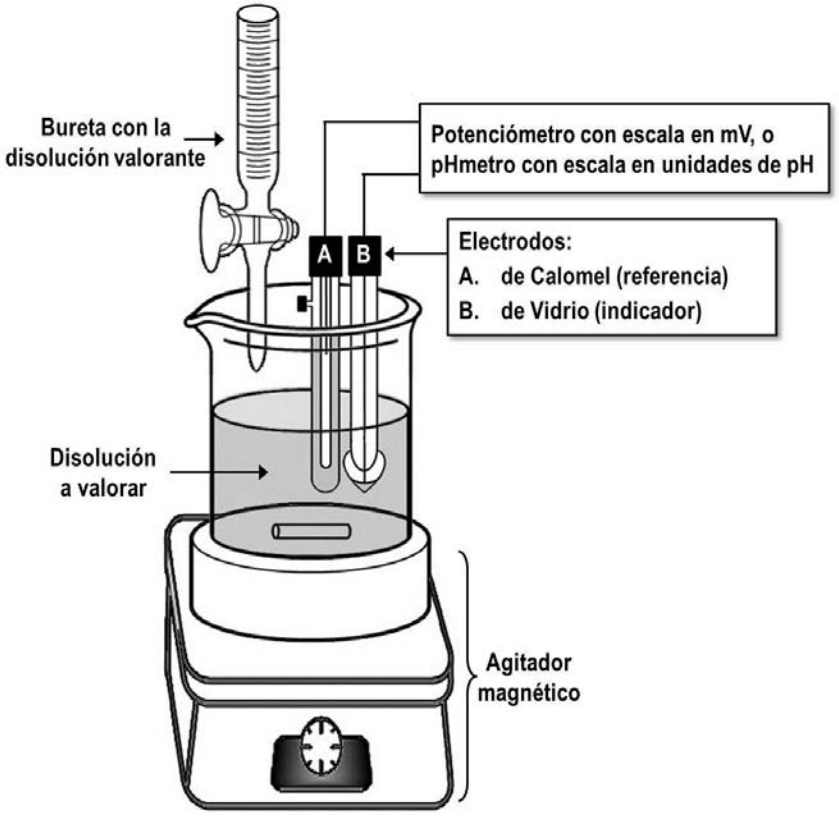


Figura 13.7. Aparato para realizar una valoración potenciométrica

En dependencia del tipo de electrodo indicador que se emplee pueden realizarse valoraciones por neutralización, precipitación, formación de complejos y oxidación reducción. En todos los casos debe concederse suficiente tiempo para la obtención del equilibrio después de cada adición de solución valorante, aunque debe señalarse que las valoraciones por precipitación pueden requerir varios

minutos para alcanzar el equilibrio, particularmente en las cercanías del punto de equivalencia. Una buena aproximación al equilibrio puede indicarse cuando el potencial medido cesa de desviarse unos pocos milivolt. La constante agitación con agitador magnético, es frecuentemente eficaz para acelerar el alcance del equilibrio.

Determinación del punto final de valoración

Pueden utilizarse varios métodos para detectar el volumen consumido de la disolución valorante para alcanzar el punto final en una valoración potenciométrica.

El método más directo es la construcción de una gráfica de potencial en función del volumen consumido de valorante (figura 13.8a), cuyo comportamiento es idéntico a las curvas obtenidas por valoraciones clásicas. El punto medio del salto brusco de potencial en la gráfica de valoración se estima de forma visual y se toma como el punto final, extrapolando hacia el eje x para la determinación del volumen consumido, V(x), y con estos datos aplicar la ley fundamental de la volumetría en cualquiera de sus variantes.

Un segundo procedimiento, más exacto, consiste en calcular el cambio del potencial por unidad de cambio en el volumen consumido de valorante, es decir $\Delta E/\Delta V$ (primera derivada). Una representación gráfica de este parámetro permite obtener un punto final más definido (figura 13.8b) con un punto de inflexión en el que resulta más fácil determinar el volumen consumido del valorante, V(x).

El tercer método consiste en representar la segunda derivada ($\Delta^2 E/\Delta V^2$) en función del cambio en el volumen consumido del valorante (figura 13.8c).

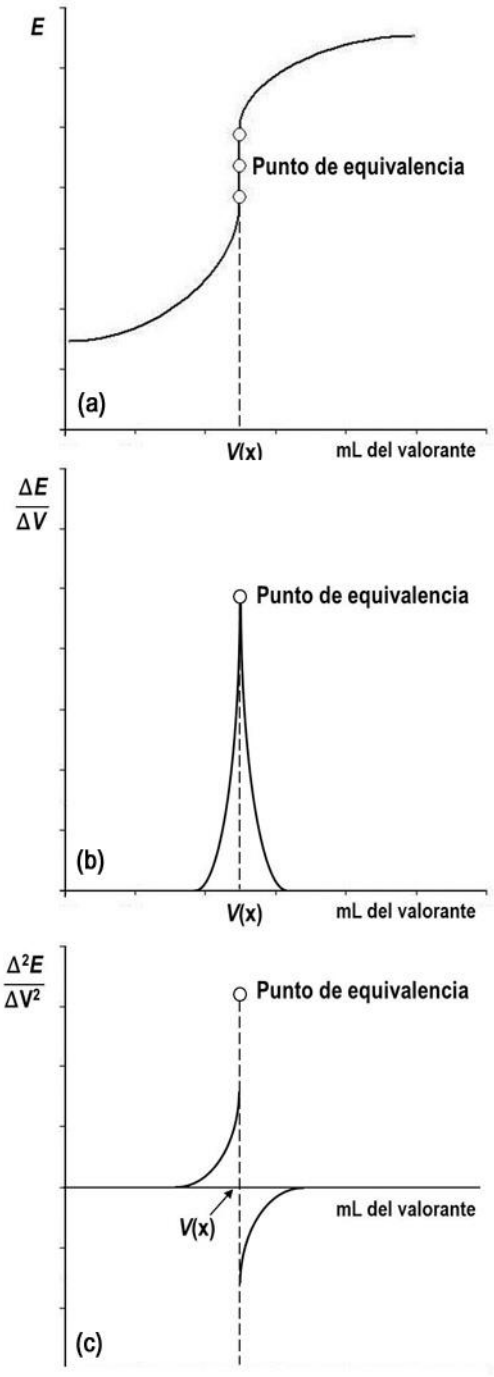


Figura 13.8. Curvas de valoración potenciométrica

Con estos métodos se supone que la curva de valoración es simétrica con relación al verdadero punto de equivalencia y que el centro de la inflexión (salto brusco) corresponde a dicho punto. Este supuesto es perfectamente válido, siempre que los participantes en el proceso químico reaccionen entre sí en una relación equimolar y también que el proceso

del electrodo sea perfectamente reversible. Corrientemente el cambio del potencial en la región del punto de equivalencia es bastante grande, por lo que, aun en el caso que no se cumplan los requisitos antes mencionados, el error que se comete puede considerarse despreciable aun tomando el punto de equivalencia en el punto medio del salto brusco. No obstante, si se desea una precisión extraordinaria o cuando se valoran soluciones muy diluidas debe tomarse en cuanta esta fuente de error y si el error es por asimetría de la curva, debe calcularse teóricamente el punto estequimétrico.

Finalmente debe señalarse que en las normas de calidad que emplean métodos potenciométricos, usualmente no hay que realizar estos procedimientos para la detección del punto final, por cuanto la técnica analítica indica al operador el valor de potencial o pH al cual debe detenerse la valoración, valores que han sido determinados previamente en el proceso de validación de la técnica analítica en cuestión.

13.4.3. Preparación de muestras y límites de detección.

En el estudio potenciométricos de soluciones no se requieren grandes procesos de preparaciones de muestras como en el caso de los métodos espectrofotométricos, por ejemplo. Se pueden analizar una gran cantidad de muestras líquidas y gaseosas. En el caso de las sólidas, estas se pueden preparar en solución y luego ser estudiadas.

Los límites de detección son de aproximadamente 10^{-5} a 10^{-6} M para electrodos convencionales. Para sensores de gas, los límites de detección varían entre 0,01 y 5 ppm.

El tiempo requerido para el análisis varía según el electrodo usado, el analito determinado y la concentración del mismo. Un electrodo de respuesta rápida, tal como el electrodo de pH, se puede calibrar y usar para determinar el pH de una muestra en 1 minuto o menos. Para electrodos de ion selectivos convencionales, los tiempos típicos de análisis de muestras sin incluir el tiempo de calibración, varían de 5 a 60 segundos, mientras que los sensores de gas y enzimáticos requieren de 1 a 5 minutos o más para la determinación de una muestra simple.

13.4.4. Aplicaciones de los métodos potenciométricos en el análisis de los alimentos

Sin dudas, la aplicación más trascendental de los métodos potenciométricos en el análisis de los alimentos, está en la medición directa del pH, dada la enorme importancia que tiene el control de este parámetro en la elaboración de los productos alimentarios, tanto como indicador de las condiciones higiénicas como para el control de los procesos de transformación; así mismo el pH de los alimentos tiene un impacto significativo en las características organolépticas de los mismos.

El pH, como la temperatura y la humedad, son importantes para la conservación de los alimentos. De ahí que generalmente, disminuyendo el valor de pH de un

producto, aumente el período de conservación. Por ejemplo, el tratamiento de alimentos en una atmósfera modificada con pH inferior a 4,6 puede inhibir la multiplicación de agentes patógenos como el "Clostridium botulinum".

En la tabla 13.1 se relaciona la importancia del control de pH para varios grupos de alimentos.

Tabla 13.1

Importancia del control del pH en algunos grupos de alimentos

Grupo de alimentos	Importancia del control del pH
Productos cárnicos	• El pH es un indicador importante de las condiciones de salud y alimentaras del animal en el momento del sacrificio. Los valores típicos deberían rotar entre pH 5.4 y 7.0, y son indicativos de una conservación correcta de la carne. Con el pasar del tiempo, el valor del pH tiende a disminuir. Además, es indicativo del grado de dureza de la carne cortada, debido a que el proceso de acidificación es diverso en los distintos cortes de carne. Valores elevados de pH caracterizan una carne más oscura, menos sabrosa y de menor valor en el mercado.
Productos lácteos	• El pH de la leche debe ser controlado desde el momento de la recolección hasta la entrega del producto, ya que es un indicador válido de sus condiciones higiénicas. El valor normal está en torno a 6.8. Valores inferiores a pH 6.8 pueden indicar una infección en el animal, que puede ser grave si el pH es inferior a 4.4. • La leche usada para la producción de quesos debe ser de óptima calidad y su pH puede variar de 6.1 y 6.5, según el tipo de queso que se debe obtener. El pH también se controla durante la elaboración y maduración de los quesos. Valores de pH comprendidos entre 4.1 y 5.3 garantizan una ralentización del crecimiento de los agentes patógenos en los quesos frescos. • En la mantequilla, el control del pH es muy importante durante las diferentes fases de su elaboración. Por ejemplo, la nata se enfría tras la pasteurización o a un valor que debe ser muy preciso. El valor del producto terminado debe ser de pH 5 aproximadamente, que en algunas condiciones puede necesitar aditivos. Un valor entre 4.5 y 6.4 del producto terminado garantiza una mayor conservación. • En la preparación del yogur, la refrigeración que sigue a la incubación de los fermentos, puede comenzar sólo cuando el valor del pH ha alcanzado valores de alrededor 4.4-4.6. La fruta agregada al yogur debe tener el mismo valor de pH para evitar reacciones no deseadas. Un producto final óptimo debería tener un pH de alrededor de 4.0-4.4 para que pueda ser conservado por más tiempo.
Bebidas	• Para la calidad de las bebidas es importante controlar el pH tanto del agua como de los jarabes y zumos. • Pequeños cambios del pH en las aguas minerales pueden indicar una contaminación de las fuentes o de los estratos naturales. • En la producción de la cerveza el pH juega un papel crucial y debe ser controlado regularmente en las diferentes fases de su elaboración, con el fin garantizar un producto con buenos estándares cualitativos. Por ejemplo, el valor pH de algunos ingredientes debe ser controlado para crear condiciones favorables a la fermentación. • En el vino, el pH varía normalmente de 2.8 a 3.8. Su control es muy importante en las diversas fases del proceso productivo, como la fermentación y la conservación. Con un pH superior a 3.5, algunas bacterias pueden atacar el vino. Incluso el sabor depende en gran medida del pH: por ejemplo, los vinos secos se convierten generalmente en ácidos. En el embotellamiento de algunos tipos de bebidas alcohólicas

Grupo de alimentos	Importancia del control del pH
	como el brandy, las botellas se enjuagan con el mismo producto. La solución de lavado se recupera y su pH va controlado con el fin que se pueda reutilizar en sucesivos ciclos.
Pan y pastas alimenticias	• El pan se conserva más tiempo si su valor pH está comprendido entre 4.0 y 5.8. Las pastas al huevo deben tener un pH ácido para evitar la reproducción de microorganismos patógenos.
Mayonesa y salsas	• Para garantizar la seguridad higiénica de salsas a base de mayonesa, éstas de acidifican agregando el vinagre o el jugo de limón, prologando en este modo el periodo de conservación de los productos.
Mermeladas, jarabes y caramelizados	• El pH del producto terminado influye en el tiempo de conservación de estos tipos de alimentos. Para las mermeladas y los jarabes debería ser en torno a pH 3.5 y para los caramelizados entre pH 4.5 y 5.0.
Frutas y verduras	• Un valor pH entre 2.5 y 5.5 prolonga la conservación de la fruta fresca e inhibe la reproducción de microorganismos. Lo mismo ocurre con la verdura en un intervalo entre 4.6 y 6.4 pH.

Si bien la medición directa del pH constituye la aplicación fundamental de la potenciometría en el análisis de los alimentos, las valoraciones potenciométricas también se utilizan con cierta frecuencia, particularmente en aquellos productos alimenticios de intensa coloración en los que se dificulta la detección del punto final de valoración a través de los métodos clásicos volumétricos con el empleo de indicadores. En estos casos no es posible realizar grandes diluciones de la porción de ensayo debido a que la disminución de la concentración del analito traería una consecuente disminución de la magnitud del salto brusco en la curva de valoración y por consiguiente un cambio paulatino en el cambio de color del indicador, lo que igualmente dificultaría la detección del punto final. De ahí que se recurra entonces a las valoraciones potenciométricas, en las cuales no es necesario emplear un indicador.

Las valoraciones potenciométricas de más frecuente aplicación son las determinaciones de acidez total y de cloruro de sodio. Las primeras se emplean en vinos, rones, cervezas, maltas, jugos de frutas, mermeladas, mieles, salsas de tomate, leches y yogur, fundamentalmente; mientras que la determinación de cloruro de sodio se aplica a conservas de vegetales y quesos, entre otros productos.

Trabajo Independiente

Consulte los apéndices D-1 y D-2, en los que aparece un resumen del presente capítulo.

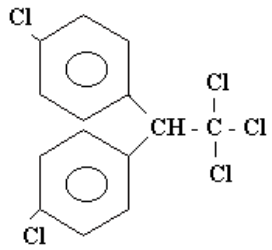
BIBLIOGRAFÍA.

1. Bermejo, R; Moreno, A. (2014). Análisis Instrumental. Editorial Síntesis S. A. Madrid.
2. Hernández, A. (1995). Análisis Químico Cuantitativo. Ed. Felix Varela. La Habana.
3. McLeod, J. A. (1973). Instrumental Methods of Food Analysis. Elek Science. London.
4. Rubinson, K & Rubinson, J. (2001). Análisis Instrumental. Pearson Educación SA. Madrid.
5. Rubinson, K. (2001). Análisis Instrumental. Pearson Education S.A. Madrid, España.
6. Sierra, M; Gómez, S; Morante, S; Pérez, D; Sanchez, A; Gañan, J. (2015). Análisis Instrumental. Experiencia de Innovación Docente en la URJC. Ed. Dykinson. Madrid.
7. Skoog, D y West, D. (1988). Análisis Instrumental. 4ta Ed., Ediciones Label.
8. Skoog, D. (2008). Principios de Análisis Instrumental. Sexta edición. Cengage Learning Editores.
9. Skoog, D; Holler, F y Nieman, T. (2001). Principios de Análisis Instrumental. Quinta edición. McGraw-Hill/Interamericana de España, S.A.U.
10. Zumbado, H. (2006). Análisis Químico de los Alimentos. Métodos Clásicos. Ed. Félix Varela. La Habana. Cuba.

14 Ejercicios y problemas

14.1. EJERCICIOS PROPUESTOS

1. El DDT (dicloro-difenil-tricloro-etano) es un insecticida clorado que puede acumularse en el organismo provocando varios efectos tóxicos por lo que su aplicación ha sido prohibida en muchos países y en otros es extremadamente controlada. Su fórmula estructural es la siguiente:



Una vez corroborada la presencia de residuos de DDT en muestras de tomate fresco se procedió a cuantificarlo a través de la Espectrofotometría UV-VIS.

a) Justifique cuidadosa y detalladamente por qué se decidió aplicar dicho método analítico para cuantificar el DDT en el tomate. Tenga en cuenta para su respuesta el fundamento del método seleccionado, las características estructurales del analito, las transiciones energéticas que se producen en el mismo y la ley en la que se basa este análisis con objetivos cuantitativos.

b) Explique cuidadosa y detalladamente como se debió proceder para la realización del análisis. Incluya en su respuesta la zona del espectro electromagnético en la que se debió realizar la determinación y qué criterios tuvo en cuenta el analista para concluir que era en dicha zona.

c) Describa las partes fundamentales del equipo empleado en el análisis y explique mediante un esquema que procesos suceden en el equipo durante cada determinación.

2. Se posee una solución de una proteína A de Masa Molar = 69000 g/mol, con una concentración de 1 mg/mL. La Absorbancia de esta solución a 280 nm (λ máxima) fue 0.8, la cubeta utilizada para la medición fue de 1 cm.

a). Explique cuidadosa y detalladamente qué se denomina por λ máxima de una especie química en este método analítico.

b). Explique el procedimiento experimental por el cual el analista pudo conocer el valor de λ máxima de la proteína A.

c). Justifique detalladamente por qué en la cuantificación de un analito las lecturas de Absorbancia generalmente deben realizarse a su λ máxima.

d). Para las mismas condiciones analíticas expuestas en el inicio, calcule el Coeficiente de Absortividad Molar o de Extinción Molar (a_M ó ε) de una solución de esta misma proteína pero con una concentración de 1 μg/mL.

3. En la determinación del contenido de nitrito de sodio ($NaNO_2$) en una muestra de carne prensada aplicando la Espectrofotometría UV-VIS, se procedió de la siguiente forma:

Preparación de la muestra.

Se pesaron exactamente 9.5200 g de carne prensada previamente triturada y homogenizada, a los que se adicionaron 40 mL de agua destilada; se mezcló y trasvasó a un volumétrico de 500 mL adicionando agua destilada hasta 300 mL aproximadamente. La suspensión se mantuvo en baño de vapor durante 2 horas y se adicionaron 5 mL de $HgCl_2$, se enrasó y se filtró.

Determinación.

Se tomó una alícuota de 10 mL de la muestra y se llevó a un volumétrico de 50 mL, se enrasó y se adicionaron 2 mL de reactivo de Griess, manteniéndose en reposo durante 1 hora para garantizar el desarrollo de color.

Paralelamente se realizó un ensayo en blanco para calibrar el equipo y eliminar interferencias.

Preparación de la curva de Calibración.

Se pesaron exactamente 0.25 g de un patrón de $NaNO_2$, los cuales fueron disueltos con agua destilada hasta completar 1 litro de disolución, de esta solución se tomaron exactamente 20 mL y se diluyeron nuevamente hasta 1L para de esta forma obtener la solución madre. Posteriormente se tomaron alícuotas de 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 y 0.6 mL, las cuales se llevaron a 6 volumétricos de 50 mL y se enrasaron con agua destilada. Finalmente se adicionaron 2 mL de reactivo de Griess y se mantuvieron las soluciones en reposo durante 1 hora con el objetivo de garantizar el desarrollo del color.

A todas las soluciones tanto patrones como muestras se les leyó la Absorbancia en un Espectrofotómetro a 520 nm, obteniéndose los siguientes resultados:

No de Tubos	B	1	2	3	4	5	6	Muestra
μg de $NaNO_2$	0	0.5	1	1.5	2	2.5	3	¿?
Absorbancia	-	0.12	0.23	0.35	0.42	0.50	0.61	0.45

Ecuación de Regresión: $y = 0.1903 X + 0.0387$
Coeficiente de Determinación: $R^2 = 0.9932$

a) ¿Cómo pudo ser determinada experimentalmente la λ a la cual se realizaron las lecturas?. Represéntelo gráficamente. Cuál o cuales de todas las soluciones que preparó el analista pueden ser utilizadas en este caso.

b) ¿Cómo cree Ud. que se preparó la solución del blanco?

c) Conociendo que la Norma de Especificaciones de Calidad de la carne prensada establece un máximo de 125 ppm (mg/Kg) para el $NaNO_2$. Diga si el lote de producto analizado está apto para su consumo?

d) ¿Qué puede Ud. opinar sobre la calidad del trabajo realizado y sobre la confiabilidad de los resultados? Fundamente su respuesta partiendo del procesamiento de los resultados experimentales y la interpretación de los parámetros obtenidos.

e) Calcule la concentración (en μg/mL) de cada una de las disoluciones de nitrito de sodio patrón y realice el procesamiento de los resultados experimentales partiendo de una curva de calibración de Absorbancia vs. μg/mL de nitrito de sodio patrón. Utilice para ello el programa estadístico SPSS. Con los resultados obtenidos responda nuevamente los incisos c) y d).

f) Si la Absorbancia de la muestra hubiera sido 0.7, qué decisión debería haber tomado el analista al obtener este resultado. Justifique su respuesta. ¿Cómo procedería desde un punto de vista práctico ante esta situación?

4. Se desea determinar el contenido de Hierro en una muestra de Carne Prensada en Conserva, almacenada durante 3 años en recipientes de hojalata.

   A. Qué técnica sugiere Ud emplear para cuantificar este metal? Explique cuidadosamente la propiedad en que se basa el método seleccionado, incluyendo en su análisis las transiciones energéticas involucradas

   B. Explique detalladamente los pasos a seguir, tanto desde el punto de vista experimental como del procesamiento de los datos, para realizar la cuantificación de Hierro empleando una Curva de Adición de Estándar. Incluya en su análisis la etapa de preparación de la muestra y el procesamiento estadístico de los resultados.

   C. Describa el equipo empleado para realizar la cuantificación, especificando las funciones que cumplen cada uno de sus elementos fundamentales.

   D. Conociendo que este metal es capaz de formar un complejo coloreado con una solución de ortofenantrolina, qué otro método instrumental Ud propone para su cuantificación? Fundamente cuidadosamente su respuesta

y explique el procedimiento a seguir si se decide aplicar una curva de calibración.

E. La composición cualitativa de los elementos metálicos presentes en la conserva cárnica se determinó por Fotometría de Llama. Con relación a este método, explique cuidadosamente:

- Fundamento.
- Transiciones energéticas involucradas.
- Procedimiento de identificación.
- Describa el equipo correspondiente.

5. En el análisis del contenido de Cobre en una muestra de cerveza se decidió emplear un método de espectroscopia de absorción atómica acometiendo la siguiente técnica:

Preparación de la muestra

Introducir la cerveza, que estará a una temperatura próxima a 20°C, en un Erlenmeyer grande y agitar, primero suavemente y después con energía hasta que la cerveza esté desgasificada. Si es necesario, eliminar la espuma o las partículas en suspensión filtrando a través de un papel de filtro seco. Tapar el embudo con un vidrio de reloj para evitar la evaporación. Después de desgasificar y filtrar, la cerveza estará a 20°C, aproximadamente. Si se filtra, asegurarse que el papel de filtro no contenga cobre.

Calibración

Introducir 0,0; 0,1; 0,2; 0,4 y 0,6 mL de una solución patrón de cobre (1000 mg/L) en cinco matraces de 100 mL, llevar hasta 1mL con agua destilada y enrasar con la cerveza que se va a analizar. Diluir 10 veces pipeteando 10 mL de cada una de las soluciones precedentes en otros cinco matraces de 100 mL y enrasar de nuevo. Se tendrá así una serie de cervezas con adiciones medidas de cobre.

Determinación

Aspirar las soluciones directamente al espectrofotómetro de acuerdo con el manual de instrucciones del aparato, usar como cero el Agua PA y medir la absorbancia de la cerveza y de los cuatro patrones correspondientes a 324.7 nm.

Cálculo. Expresar la concentración de cobre en mg/L con dos cifras decimales.

Al concluir el análisis se obtuvieron los siguientes resultados experimentales:

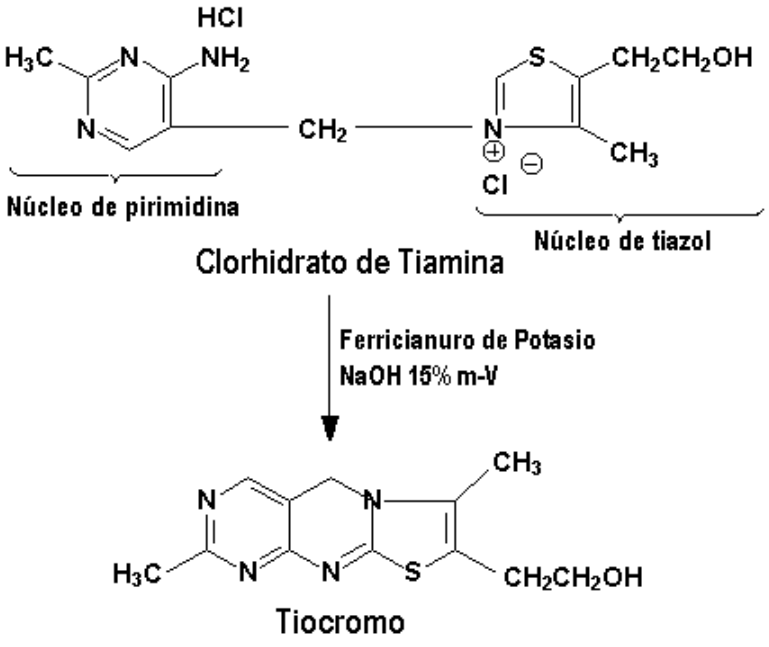
Solución	mL de la solución patrón de Cu	Absorbancia
1	0	0.051
2	0.1	0.105
3	0.2	0.165
4	0.4	0.284
5	0.6	0.371

A. ¿Qué concentración de Cobre en mg/L posee cada una de las soluciones de la curva de calibración?

B. Calcule la concentración de Cobre en la cerveza analizada. Exprese sus resultados en mg/L. Emplee para ello el método de regresión lineal.

C. Atendiendo a la Ecuación de Regresión y al Coeficientes de Determinación. Qué puede Ud. opinar sobre la calidad del trabajo realizado y sobre la confiabilidad de los resultados? Fundamente su respuesta partiendo del procesamiento de los resultados experimentales y la interpretación de los parámetros obtenidos.

6. La determinación de Vitamina B_1 (Tiamina) en productos cárnicos puede realizarse empleando un método Fluorimétrico. La tiamina se extrae en medio ácido y con calor y posteriormente se oxida con Ferricianuro de Potasio en medio alcalino (pH= 10), El Tiocromo resultante de la oxidación, de intensa fluorescencia azul, el cual se extrae finalmente con alcohol isobutílico para medirlo fotoeléctricamente.



En la determinación del contenido de Tiamina en muestras de carne de cerdo, se procedió de la siguiente forma:

Preparación de la muestra

Se tomaron alrededor de 200 gramos de carne, se picó en trozos y se trituró y homogenizó convenientemente. Se pesaron entonces en un erlenmeyer de 250 mL, 20.32 g de producto al cual se adicionaron 100 mL de solución de HAc 2% m-V. La mezcla se reflujó durante 15 minutos y luego se centrífugó y filtró sobre papel. Al filtrado se añadió solución de ácido tricloroacético (TCA) con el objetivo de precipitar las proteínas y posteriormente se centrifugó y filtró nuevamente. Al filtrado se añadió 0.5 mL de ferricianuro de potasio, 3 mL de NaOH 15% m-V y 20 mL de isobutanol. La mezcla se agitó, se centrífugo y se decantó la fase orgánica en un embudo separador con el cual se eliminaron totalmente los restos de fase acuosa. La fase orgánica se trasvasó cuantitativamente a un volumétrico de 100 mL y se enrasó con isobutanol.

Calibración

Se preparó una solución patrón de Tiamina a una concentración de 100 μg/mL, a partir de la cual se tomaron alícuotas de 1, 1.5, 2, 2.5 y 3 mL y se vertieron respectivamente en 5 volumétricos de 100 mL. Se añadió entonces a cada solución 0.5 mL de ferrocianuro de potasio, 3 mL de NaOH 15% m-V y se enrasó hasta 100 mL con isobutanol.

Determinación

Se operó según las especificaciones del equipo ajustando el monocromador primario a 365 nm y el monocromador secundario a 435 nm. Se leyeron los %Fluorescencia de las soluciones patrones y de la muestra obteniéndose los siguientes resultados:

Solución	mL de la solución patrón de Tiamina	%Fluorescencia
1	1	15.8
2	1.5	22.1
3	2	46.3
4	2.5	60.5
5	3	73.9
M	–	21.5

A. Explique el fundamento general de los métodos fluorimétricos señalando las transiciones energéticas involucradas.

B. Discuta cuidadosa y detalladamente la función de los reactivos, soluciones y operaciones subrayadas.

C. Calcule la concentración de Tiamina en el producto analizado. Exprese sus resultados en mg Tiamina/ 100 g de producto. Emplee para ello el método

de regresión lineal expresando la concentración de los patrones en μg de Tiamina/mL y en μg de Tiamina.

D. Atendiendo a la Ecuación de Regresión y al Coeficiente de Determinación. Qué puede Ud. opinar sobre la calidad del trabajo realizado y sobre la confiabilidad de los resultados? Fundamente su respuesta partiendo del procesamiento de los resultados experimentales y la interpretación de los parámetros obtenidos.

   En el caso de que sus resultados no sean confiables, exponga las posibles causas que condujeron a estos resultados. Proponga una solución práctica para resolver el problema y, en el caso que sea posible, recalcule la concentración de Tiamina (mg/100 g) en el producto analizado.

7. Una muestra de Aceite de Oliva resulta sospechosa de encontrarse adulterada con Aceite de Coco. Para corroborar o rechazar esta sospecha se decide aplicar un método Refractométrico de análisis.

   a. ¿Cómo podría Ud conocer si el Aceite de Oliva se encuentra realmente adulterado?

   b. En el caso de que la sospecha fuera corroborada; describa detalladamente el procedimiento que Ud emplearía para conocer las proporciones en que se encuentra cada aceite en la muestra objeto de análisis.

8. Para conocer si el azúcar presente en una solución era sacarosa se decidió aplicar un método instrumental, él que permitió llegar al siguiente resultado $[\alpha]_D^{20}$ = + 66.5, concluyéndose que efectivamente era una solución de sacarosa.

   A. Identifique el método aplicado y explique detalladamente su fundamento.

   B. Justifique cuidadosamente por qué se pudo aplicar el método en cuestión para cumplimentar el objetivo del análisis.

   C. Para calcular $[\alpha]_D^{20}$, qué datos se necesitan y cómo se obtienen los mismos?

   D. Cómo debió procederse para realizar el análisis anterior en el laboratorio y llegar a la conclusión expuesta?

9. Estudie cuidadosamente cada una de las técnicas de análisis que a continuación se relacionan y realice para cada una de ellas un análisis crítico sobre la base de los siguientes aspectos:
   - Explique la función de los reactivos, soluciones, operaciones y parámetros operacionales utilizados.
   - Explique el procesamiento de los resultados para realizar los cálculos propuestos en los casos que sea pertinente.
   - Identifique los elementos que están ausentes en los procedimientos y que le imposibilitan fundamentar con profundidad algunos aspectos de la técnica en cuestión.

***Técnica 1*. Determinación de anhidrido sulfuroso en cerveza**

1.1. Principio.

El SO_2 se destila en medio ácido y se lleva a una solución tamponada de DTNB por medio de una corriente de nitrógeno. El producto formado en la reacción se mide por espectrofotometría.

1.2. Material y aparatos.

1.2.1. Aparato (figura 1.1.), provisto de:

- Matraz de fondo redondo de 250 mL, con tres bocas, una central y dos laterales en ángulo.
- Embudo de decantación de 100 mL en forma de pera.
- Tubo acodado con macho esmerilado, para entrada de gases, longitud aproximada de vástago de 150 mL.
- Refrigerante doble superficie, longitud total 300 mL y longitud útil de 200 mL.
- Bola retención proyecciones, salida inclinada.
- Colector acodado largo.
- Tubo filtrante

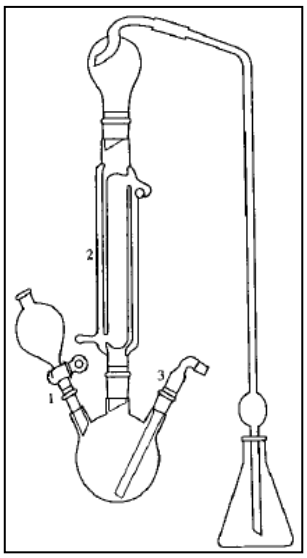


Figura 1.1

1.2.2. Espectrofotómetro que permite lecturas a una longitud de onda de 415 nanómetros.

1.3. Reactivos.

1.3.1. Solución Tampón de Fosfato, pH 8,0. Disolver 2,27 g de di-Sodio Hidrógeno Fosfato anhidro PA-ACS y 0,245 g de Potasio di-Hidrógeno Fosfato PA-ACS-ISO, ambos pesados en estado anhidro, en 1 l de Agua PA-ACS. Comprobar el pH y ajustar, si es necesario, con Sodio Hidróxido o un ácido.

1.3.2. DTNB. Disolver 1 g de 5,5' - Ditiobis (Acido Nitrobenzoico), en una mezcla de 900 mL de solución tampón y 100 mL de Etanol 96% v/v PA.

1.3.3. Solución de Acido Clorhídrico, aproximadamente 4 N. Diluir convenientemente Acido Clorhídrico 35% PA-ISO en Agua PA-ACS.

1.4. Procedimiento.

1.4.1. Una vez montado el equipo de destilación, introducir 50 mL de Acido Clorhídrico en el matraz de destilación. Calentar durante cinco minutos, aproximadamente, mientras se hace llegar al interior del matraz una corriente de nitrógeno. Introducir en el matraz 25 mL de cerveza medidos exactamente. Recoger el SO_2 desprendido en un matraz que contiene 50 mL de reactivo. El tubo filtrante permanecerá sumergido en la solución durante todo el proceso de destilación, que se detendrá después de ocho minutos.

Desmontar el tubo filtrante y enjuagar con unos mililitros de solución tampón. Trasvasar cuantitativamente el contenido del matraz (destilado, reactivo y solución tampón), a un matraz aforado de 100 mL y enrasar con Agua PA-ACS.

Medir la densidad óptica en una celda de 1 cm de recorrido a una longitud de onda de 415 nanómetros con relación a un ensayo en blanco recientemente preparado. El ensayo en blanco se prepara diluyendo 50 mL de reactivo con 50 g de Solución Tampón.

1.4.2. Determinación de la curva patrón. Preparar soluciones acuosas patrón de Potasio Bisulfito PA, cuyo contenido de SO_2 se habrá determinado previamente por yodometría, que contengan 2; 5; 10; 15 y 20 mg de SO_2 por litro.

Las soluciones patrón se tratan de la misma forma que la cerveza, esto es, destilándolas previamente.

1.5. Cálculo.

El contenido de SO_2 en mg/l vendrá dado por la siguiente fórmula:

SO_2 en mg/l = A x f

Siendo:

A = absorbancia medida.

f = factor determinado mediante la curva patrón.

Técnica 2. Determinación de almidón en productos cárnicos

2.1. Principio.

Extracción de azúcares simples con etanol caliente 80%, permaneciendo el almidón. El residuo de almidón se solubiliza con ácido perclórico diluido, y medida a 630 nm de color desarrollado al calentarlo con el reactivo antrona-ácido sulfúrico.

2.2. Material y aparatos.

2.2.1. Balanza analítica.

2.2.2. Matraces aforados de 100 mL y 200 mL.

2.2.3. Tubos de centrífuga, cónicos, de 100 mL.

2.2.4. Pipetas graduadas de 10 mL, 25 mL, 5 mL y 2 mL.

2.2.5. Centrífugas de 2.500 r.p.m.

2.2.6. Baño de agua.

2.2.7. Baño de agua termostatable hasta 25°C.

2.2.8. Probeta graduada de 25 mL.

2.2.9. Papel de filtro Albet número 238 o equivalente.

2.2.10. Espectrofotómetro capaz de lecturas de 630 nm.

2.3. Reactivos.

2.3.1. Disolución de Acido Sulfúrico-Antrona. Disolver 0,2 g de Antrona PA-ACS en 100 mL de Acido Sulfúrico 96% PA-ISO. El reactivo sirve para 3-4 días conservándolo a 0°C.

2.3.2. Glucosa patrón. Disolver 0,1 g de D(+)- Glucosa PA en 100 g de Agua PA-ACS

2.3.3. Acido Perclórico al 52%. Diluir Acido Perclórico 60% PA-ACS-ISO en Agua PA-ACS y ajustar a la concentración indicada.

2.3.4. Etanol al 80%. Diluir Etanol 96% v/v PA en Agua PA-ACS y ajustar a la concentración indicada.

2.4. Procedimiento.

2.4.1. Extracción de azúcar y de grasa. Pesar 2,0 g de carne triturada, preparada como en el método 1, en un tubo centrífugo cónico de 100 mL. Añadir 25,0 mL de disolución Etanol-Eter de Petróleo 50-70°C PA (1-3), tapar con un tapón, agitar vigorosamente y centrifugar a 2.500 r.p.m. durante cinco minutos. Decantar y dejar a un lado la disolución Etanol-Eter de Petróleo 50-70°C PA.

Añadir 10 mL de etanol caliente al 80%, agitar y centrifugar a 2.500 r.p.m. durante cinco minutos. Dejar a un lado la disolución alcohólica y repetir la extracción alcohólica con Etanol caliente.

2.4.2. Extracción de Almidón. Añadir 5,0 mL de Agua PA-ACS al residuo y remover. Añadir 6,5 mL de disolución de Acido Perclórico diluido (52%); remover o agitar durante cinco minutos. Dejar reposar durante quince minutos. Añadir 20,0 mL de Agua PA-ACS y centrifugar durante cinco minutos.

Verter la disolución de Almidón en un frasco volumétrico de 100 mL. Añadir 6,5 mL de disolución de Acido Perclórico (52%) y remover. Dejar reposar durante treinta minutos. Remover y lavar el contenido entero del tubo en el frasco volumétrico que contiene el primer extracto. Llevar a volumen y filtrar por papel filtro.

2.4.3. Determinación de Almidón. Diluir 5 mL de disolución de almidón filtrada en 200 mL con Agua PA-ACS. Pipetar 5 mL de dicha disolución en un tubo, enfriar en baño de agua y añadir 10 mL de Antrona reactivo (2.3.1.). Mezclar completamente y calentar durante cinco minutos a 100°C. Quitar el tubo del baño, enfriar con rapidez a 25°C y determinar la absorbancia a 630 nm. El color permanece fijo durante treinta minutos.

2.5. Cálculo.

2.5.1. Curva patrón de glucosa. Diluir 1,2, 5 y 10 mL de glucosa patrón (2.3.2.) hasta 100 mL con agua destilada. A partir de las lecturas obtenidas dibujar la curva patrón.

2.5.2. Contenido en almidón de la muestra:

Glucosa (porcentaje) = 0,04 P

Almidón (porcentaje) = 1,06 M

Siendo:

P = µg de glucosa leídos en la curva patrón.

M = porcentaje total de glucosa obtenido.

2.6. Observaciones.

2.6.1. Teniendo en cuenta que el carragenato se determina como almidón, se deberá deducir del valor obtenido de almidón el correspondiente de carragenato.

2.6.2. En los productos que declaren contener carragenato y hasta que no exista técnica oficial para su determinación cuantitativa se permitirá una tolerancia del 1,4% en el valor obtenido de almidón.

2.6.3. Cuando la naturaleza de la muestra lo requiera se podrán repetir las extracciones hasta que el producto quede completamente libre de grasas y azúcares.

***Técnica 3*. Determinación de cobre en pastas alimenticias**

3.1 Principio.

Determinación del cobre por A.A. previa mineralización de la muestra.

3.2. Material y aparatos.

3.2.1. Espectrofotómetro de A.A.

3.2.2. Lámpara de cobre.

3.2.3. Cápsula de platino, cuarzo o similar.

3.2.4. Baño de arena o placa calefactora.

3.2.5. Horno eléctrico (mufla) con dispositivo de control de temperatura.

3.3. Reactivos

3.3.1. Acido Nítrico 70% PA-ACS-ISSO (d=1,413).

3.3.2. Acido Nítrico al 1% en Agua PA-ACS (v/v). Diluir Acido Nítrico 70% PA-ACS-ISO con Agua PA-ACS, hasta la concentración indicada.

3.3.3. Cobre solución patrón Cu = 1,000 ±0,002 g/l AA.

3.4. Procedimiento.

3.4.1. Preparación de la muestra. Preparación de la muestra. Poner 10 g de la muestra en la cápsula, llevar sobre la placa calefactora teniendo cuidado que la combustión no sea demasiado rápida de manera que no haya pérdidas de materia sólida por proyección.

Añadir a continuación 2 mL de Acido Nítrico 70% PA-ACS-ISO y carbonizar el residuo en el baño de arena o placa calefactora.

Seguidamente introducir la cápsula en la mufla y mantenerla a 450°C hasta mineralización total. Dejar enfriar. Disolver a continuación las cenizas con Acido Nítrico 70% PA-ACS-ISO y Agua PA-ACS. Llevar la solución a un matraz de 10 mL, lavar la cápsula con Agua PA-ACS y añadir las aguas de lavado hasta el enrase, filtrando posteriormente.

3.4.2. Construcción de la curva patrón. Diluir parte alícuota de la solución patrón (3.3.3.) con Acido Nítrico del 1% para obtener soluciones que contengan de 1 a 5 mg de Cu/l.

3.4.3. Determinación. Igual que para el plomo. Operar según las especificaciones del aparato; usando llama de aire-acetileno. Medir las absorbancias de la muestra y patrones a 324,7 nm. Si la solución está muy concentrada diluirla con Acido Nítrico al 1%.

3.5 Cálculos.

Partiendo de los valores de absorbancia obtenidos para la muestra, hallar mediante la curva patrón las concentraciones de cobre de la muestra.

Técnica 4. Determinación de potasio en zumo de uvas

4.1. Principio.

El potasio se determina por fotometría de llama previa adición de litio cloruro, para evitar la ionización parcial de los metales en la llama.

4.2. Material y aparatos.

4.2.1. Espectrofotómetro de absorción atómica.

4.2.2. Material de uso normal en laboratorio.

4.3. Reactivos.

4.3.1. Potasio solución patrón K = 1,000 ± 0,002 g/l AA o preparar disolviendo 1,907 g de Potasio Cloruro PA-ACS-ISO en un litro de Agua PA-ACS.

4.3.2. Solución de Litio Cloruro: Disolver 37,3 g de Litio Cloruro PRS en 100 mL de Agua PA-ACS.

4.3.3. Soluciones de Potasio de 0; 1; 2; 3; 5 y 7 mg/l preparadas a partir de la solución de Potasio, previa adición de la cantidad necesaria de Litio Cloruro PRS, para que el Litio se encuentre en una proporción de aproximadamente 2.000 mg/l.

4.4. Procedimiento.

Tomar 1 mL de la muestra y llevar a 200 mL con Agua PA-ACS (previa adición de la cantidad necesaria de Litio Cloruro PRS para que el Litio se encuentre en una proporción de aproximadamente 2.000 mg/l), leyéndose en fotometría de llama frente a las soluciones de referencia a 766-770 nm.

4.5. Cálculos.

El contenido de potasio se calcula a partir del valor obtenido en el espectrofotómetro por comparación con la curva patrón, teniendo en cuenta la dilución efectuada. Los resultados se expresan en mg de Potasio/ 100 mL de la muestra.

4.6. Observaciones.

Puede utilizarse una solución de 40 g/l de cloruro de cesio en lugar de cloruro de litio, siendo en este caso la concentración adecuada de cloruro de cesio en las disoluciones de la muestra y patrones entre 0,1-0,4%.

10. Los Tiouracilos son compuestos con actividad antitiroidea que pueden llegar al ganado a través de los pastos. La determinación de estas sustancias en Carnes y Productos Cárnicos reviste gran importancia y se realiza empleando una técnica de Cromatografía en Columna.

    El fundamento general de la metodología seguida para el análisis es el siguiente:

    Extracción del antitiroideo con alcohol metílico, evaporación del disolvente, dilución con agua y purificación con eter etílico. Evaporación del extracto acuoso hasta sequedad, posterior disolución en una mezcla Cloroformo - Alcohol Metílico (1:1) y Cromatografía en Columna de Oxido de Aluminio (Al_2O_3) eluyendo con mezcla Triclorometano - Alcohol Metílico (1:1).

    Se aplicaron a la columna 30 mL del extracto de tioracilos obtenido y luego se hizo pasar por la columna 30 mL de la mezcla Triclorometano - Alcohol Metílico (1:1). Se desecharon los primeros 8 mL y el resto se recogió en un balón de boca esmerilada. Se evaporó a sequedad el contenido del matraz en rotoevaporador a 60°C, con ayuda de vacío, y se recogió el residuo de la

evaporación en 20 mL de una .solución tampón pH 7,6, se añadieron 2 mL de solución de Dicloroquinona- Clorimida, se agitó 20 segundos y se dejó reposar 20 minutos. Finalmente se leyó la absorbancia a 435 nm.

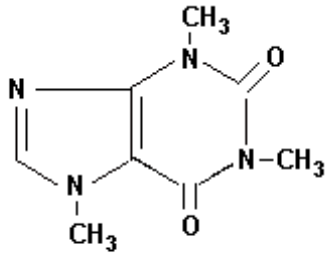
Nota: La actividad del Al_2O_3 fue controlada a través de un ensayo de recuperación con una solución patrón de Tiouracilo, cromatografiando 10 mL de la misma, con el empleo de idéntica Fase Móvil y Estacionaria. El eluato obtenido se hizo reaccionar con Dicloroquinona-Clorimida y al complejo coloreado resultante se le midió la absorbancia a 435 nm. Paralelamente se desarrolló el color bajo las mismas condiciones a 10 mL de solución patrón de Tiouracilo no cromatografiada y se midió su absorbancia a la misma longitud de onda. En ambos casos las absorbancias obtenidas fueron idénticas.

A. Explique el principio químico físico en el cual se fundamenta esta separación.

B. Explique cuidadosamente la función de las soluciones y operaciones subrayadas.

C. Describa detalladamente el procedimiento a seguir para cuantificar estos antitiroideos.

11. La determinación del contenido de cafeína en té se realiza aplicando un método de cromatografía en columna, con previa extracción del analito a partir de la matriz molida y en presencia de MgO. Posteriormente se filtra y se realiza una dilución para obtener la solución de muestra a cromatografiar, que en muchos casos puede presentar también mínimas cantidades de otros alcaloides. Se introducen 10 mL de muestra en una columna cromatográfica empacada con fase reversa. Posteriormente se hace pasar a través de la columna una mezcla metanol:agua en proporción inicial 1:1 y se va incrementando la cantidad de metanol hasta alcanzar una proporción 3:1, lo cual se logra a los 30 minutos de corrida.



Cafeina

A. Explique el principio químico físico en el cual se fundamenta esta separación.

B. ¿Qué tipo de elución se llevó a cabo?

C. ¿Cómo se realiza la recogida de los eluatos y cómo podría Ud detectar las fracciones correspondientes a los alcaloides luego de la separación cromatográfica? Fundamente cuidadosamente su respuesta.

D. Dibuje el cromatograma obtenido conociendo que lograron separarse 3 alcaloides y que su polaridad disminuye en el siguiente orden: cafeína > alcaloide 2 > alcaloide 1. Se sabe además que la concentración de los mismos en el extracto cromatografiado aumenta en orden inverso.

E. Describa detalladamente el procedimiento a seguir para cuantificar la cafeína. Asuma que los resultados deben expresarse en μg/mL.

12. La determinación de Ácido Láctico en una muestra de vino de uvas se fundamenta en el siguiente principio:

Aislamiento del Acido Láctico en una columna empacada con resinas intercambiadoras de aniones, oxidación a acetaldehído y medición espectrofotométrica del complejo coloreado formado por la reacción con la Piridina.

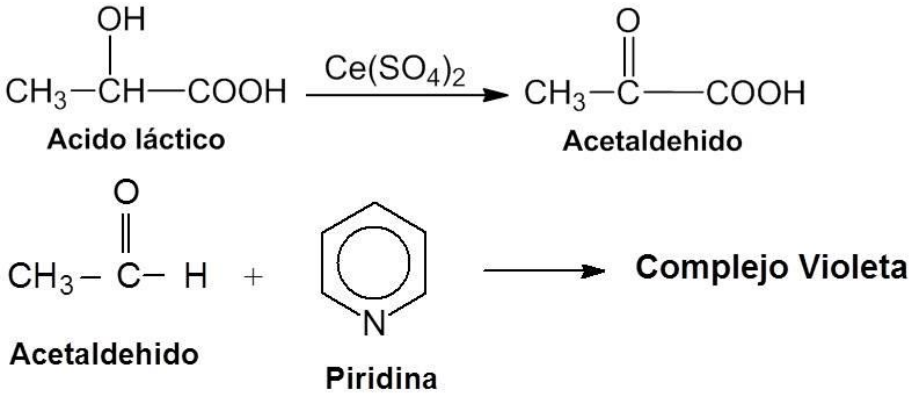
Para realizar el análisis se toman 10 mL del vino y se hacen pasar a través de una columna cromatográfica empacada con una resina Lewatit MP 600 fuertemente aniónica, la cual ha sido previamente lavada 4 veces con solución de Acido Acético 0.5% m-V.

Una vez aplicada la muestra, la columna es nuevamente lavada 7 veces con 10 mL de agua destilada cada vez, desechándose los eluatos obtenidos, y posteriormente se hace pasar a través de la misma una solución de Sulfito de Sodio (Na_2SO_3) 0.5 N, recogiéndose ahora el eluato en un volumétrico hasta un volumen de 50 mL.

Terminada esta operación, se toma del matraz una alícuota de 10 mL y se vierte en un tubo de ensayo al que se añaden 10 mL de Sulfato de Cerio IV; se coloca el tubo en baño termostatado a 65°C durante 10 minutos y el acetaldehído producido se hace reaccionar con solución de Piridina al 10%. Al complejo violeta formado se le mide la absorbancia a una λ= 570 nm.

A. Mencione y explique cuidadosamente el mecanismo de separación en el cual se fundamenta el aislamiento del Acido Láctico, previo a la determinación espectrofotométrica. Tenga en cuenta para su explicación la función de los reactivos, soluciones y operaciones subrayadas:

B. ¿Por qué cree Ud que la medición espectrofotométrica se realizó a una λ= 570 nm? Justifique cuidadosamente su respuesta considerando el fundamento del método empleado y las transiciones energéticas involucradas. ¿Cómo pudo ser determinado experimentalmente este valor de λ? Represéntelo gráficamente.



C. A través de qué procedimiento podría Ud cuantificar el Ácido Láctico aislado del vino. Explique cuidadosamente los pasos a seguir para cumplimentar dicho objetivo incluyendo el procesamiento estadístico de los resultados.

D. A través de qué método o métodos espectroscópicos pudiera detectarse la presencia de Sodio y Potasio en el vino objeto de análisis. Fundamente su respuesta considerando:

- Fundamento del método. Ventajas e inconvenientes de su aplicación.
- Preparación de la muestra.
- Procedimiento de identificación empleado.

13. Las aminas biógenas, entre ellas la histamina y la tiramina, pueden ser encontradas en pescados y quesos, entre otros alimentos. Estas aminas son productos de la descarboxilación de aminoácidos libres y su determinación es importante debido a su alta toxicidad y a que evidencian la existencia de actividad bacteriana que en la mayoría de los casos no es deseada.

Para determinar la presencia y concentración de aminas en un lote de queso se aplicó la técnica de HPLC a un extracto obtenido de la matriz, utilizando las siguientes condiciones cromatográficas:

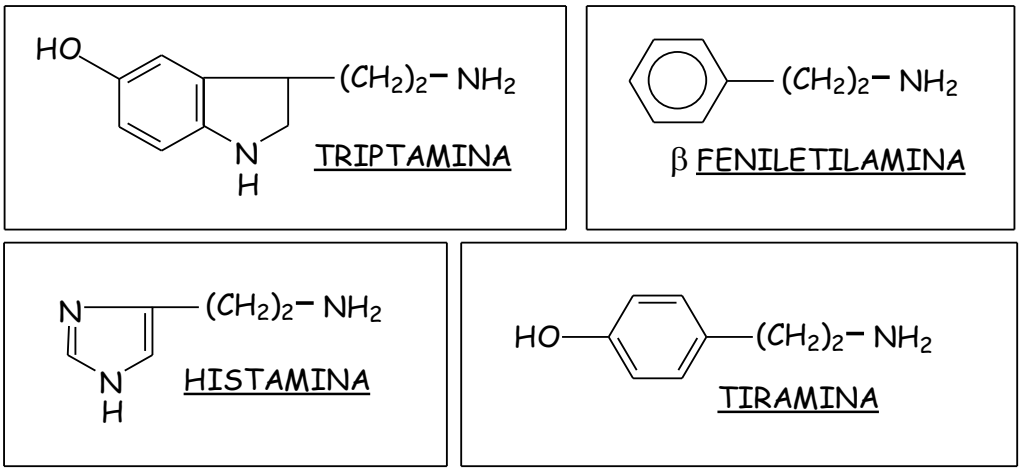
- Volumen de inyección: 10 μL.
- Columna Spherisorb ODS 2 - C-18. (5 μm), 250 mm x 4 mm
- Elución con Acetonitrilo-Metanol (1:1).
- Velocidad de flujo: 1.5 mL/min.
- Detector: UV-VIS con arreglo de diodos.

En el análisis fue necesario, según el analista, obtener cromatogramas de soluciones patrones de diferentes aminas a concentraciones de 1mg/mL. Los tiempos de retención (Tr) obtenidos para cada uno de los patrones inyectados fueron: Histamina (15 min), Triptamina (8.5 min), Tiramina (18 min) y β feniletilamina (10 min); realizándose la detección a 254 nm.

A. Justifique cuidadosa y profundamente la necesidad de obtener los cromatogramas de estos patrones atendiendo a los objetivos del análisis.

B. Explique detalladamente el mecanismo físico-químico en el cual se fundamenta la separación de las aminas presentes en el queso.

C. Justifique lo más profundamente posible por qué pudo emplearse un detector UV para realizar la detección de las aminas. Apóyese en el principio en que se fundamenta la detección, en las estructuras de las sustancias y en sus características espectroscópicas fundamentando las transiciones energéticas involucradas.



El análisis se llevó a cabo ensayando 2 longitudes de onda en el detector (254 nm y 280 nm), obteniéndose los siguientes resultados:

Para λ = 254 nm			**Para λ = 280 nm**		
Pico	Tr (min)	Area	Pico	Tr (min)	Area
1	8.50	125	1	8.50	214
2	10.0	254	2	15.0	91
3	15.0	100	3	18.0	164
4	18.0	412			

D. Fundamente detalladamente las diferencias obtenidas en las condiciones ensayadas, sobre la base del número de picos obtenidos, los tiempos de retención y las áreas resultantes para cada componente. Sobre la base del análisis realizado: A qué valor de λ realizaría usted la detección si desea obtener buenos resultados?

E. Identifique las aminas presentes en el queso analizado y arribe a conclusiones sobre el orden de polaridad de las mismas. Fundamente cuidadosamente su respuesta.

F. Proponga un procedimiento para cuantificar la tiramina explicando cuidadosa y detalladamente los pasos para cumplimentar dicho objetivo. Incluya en su análisis el procesamiento matemático de los resultados y la

utilidad que de este procesamiento se deriva. Considere que los resultados deben expresarse en mg de tiramina/ 100 g de queso.

G. Analice las posibles afectaciones (aumenta, disminuye o no se afecta) que provocarían cada una de las siguientes modificaciones sobre los tiempos de retención, la resolución del cromatograma y el área bajo la curva de los picos obtenidos.

- Utilizar un sistema de solventes Tetrahidrofurano:Metanol (3:1)
- Disminuir la velocidad de flujo a 1 mL/min
- Utilizar una columna cromatográfica Spherisorb ODS 2 - C-18. (10 μm), 200 mm x 4 mm.
- Inyectar 5 μL
- Utilizar un detector de índice de refracción

Fundamente cuidadosamente su respuesta teniendo en cuenta los factores que afectan la eficiencia de una columna cromatográfica. Tenga en cuenta que la polaridad de los solventes más empleados en HPLC es la siguiente:

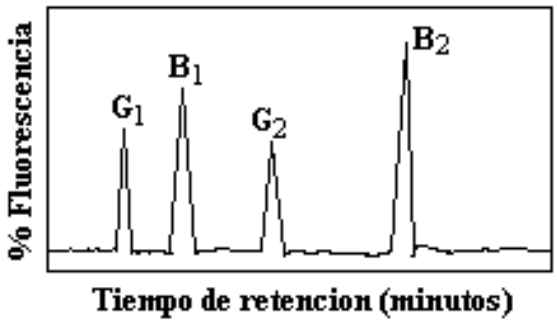
Tetrahidrofurano < Acetonitrilo < Metanol < Agua

H. En la literatura se reporta que para el análisis de aminas biógenas puede también emplearse la cromatografía gas-líquido. Señale las condiciones de trabajo que se necesitan definir para su aplicación y explique su función en el análisis.

14. Las Aflatoxinas (G_1, G_2, B_1 y B_2) son productos metabólicos del hongo *Aspergillus flavus*, el cual puede contaminar alimentos como el maní y los cereales fundamentalmente. Estos compuestos son potentes carcinógenos (producen cáncer) del hígado, de ahí la importancia de su detección en los alimentos, la cual puede realizarse por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC), empleando las siguientes condiciones:

- Columna: Bondapak RP-8
- Sistema de solventes: Acetonitrilo : Agua (10:90)
- Volumen de inyección: 10 μL
- Velocidad de flujo: 1 mL/min
- Detector fluorométrico 365 nm.

Para aplicar la técnica de HPLC se requiere realizar un tratamiento previo a la muestra con Ácido Trifluoracético para que puedan ser detectadas G_1 y B_1. El cromatograma obtenido fue el siguiente:



y las áreas bajo la curva obtenidas para cada pico fueron: G_1 (312), B_1 (411), G_2 (335) y B_2 (526).

A. Analice la afinidad de cada Aflatoxina por la fase estacionaria y arribe a conclusiones acerca de la polaridad de estos componentes.

B. La derivatización de la muestra fue necesaria para detectar 2 de las Aflatoxinas. Explique el fenómeno físico químico en que se fundamenta dicha detección.

C. En la cuantificación de Aflatoxina B_1 se empleó un procedimiento que arrojó los siguientes resultados:

Concentración de Aflatoxina B_1	Area
10 μg/L	193
20 μg/L	315
40 μg/L	555
60 μg/L	789
80 μg/L	1091

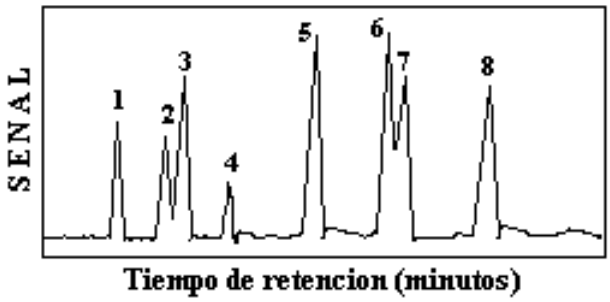
Explique cuidadosamente la vía de cuantificación empleada indicando las condiciones cromatográficas que deben emplearse para acometer el análisis. Calcule la concentración de Aflatoxina B_1 en la mezcla inyectada y arribe a conclusiones sobre la confiabilidad de sus resultados.

D. Si al aplicar HPLC no se obtiene una buena resolución de la mezcla. ¿Cuáles de las siguientes operaciones pudieran, a su entender, solucionar el problema? Justifique cuidadosamente su selección.

- Disminuir el tamaño de partículas del empaque de la columna.
- Disminuir la longitud de la columna
- Variar la composición de la fase móvil.
- Disminuir el volumen de inyección
- Aumentar la velocidad de flujo.
- Utilizar un detector UV con arreglo de diodos.
- Variar el régimen de elución durante el análisis.

- Aumentar la sensibilidad del detector

15. En el análisis de la composición en Acidos Grasos del Aceite de Salvado de Arroz, se decidió aplicar un método de Cromatografía Gaseosa para lo cual fue necesario primeramente hidrolizar los Acilglicéridos y luego derivatizar los Acidos Grasos Libres para analizarlos en forma de Esteres Metílicos. Las condiciones cromatográficas empleadas así como el cromatograma obtenido se muestran a continuación:



Columna = 2 m x 4 mm empacada sobre soporte DC-200 / Temperatura de la columna = 190°C / Velocidad de Flujo = 25 mL/min / Volumen de inyección = 10 μL / Detector = Conductividad Térmica.

A. Que parámetros cromatográficos usted variaría para mejorar la resolución del cromatograma obtenido. Fundamente cuidadosamente su respuesta.

B. Una vez mejorada la resolución del cromatograma ¿Cómo procedería Ud para identificar el Acido Graso correspondiente al pico 5?

C. Suponiendo que el pico No 5 se corresponde con el Ácido Linoleico. Explique detalladamente cómo procedería para cuantificar el mismo si decide aplicar el método del patrón interno. Mencione además la ventaja de este procedimiento de cuantificación en comparación con una curva de calibración.

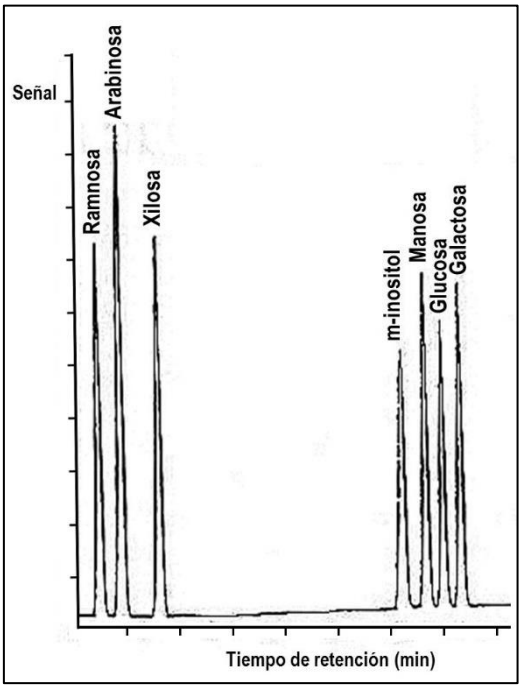
D. Teniendo en cuenta que el resto de los ácidos grasos identificados en el cromatograma fueron: palmítico, oleico, linolénico, esteárico, araquídico, araquidónico y palmitoleico. Explique detalladamente a través de qué procedimiento podría Ud determinar en qué proporción se encuentra el ácido palmítico en la mezcla cromatografiada.

16. En un estudio para identificar y cuantificar los diferentes monómeros que forman parte de los polisacáridos que componen la fibra alimentaria en varios productos vegetales, se decidió aplicar un método de cromatografía de gases.

El proceso en cuestión consta de tres etapas, las cuales se describen a continuación:

- **Aislamiento de la fibra alimentaria:** Partiendo de una cantidad de muestra, exactamente pesada, entre 200 y 300 mg, el aislamiento de la fibra se realiza aplicando un tratamiento previo con dimetilsulfóxido (DMSO) para gelatinizar el almidón. A continuación se procede a una hidrólisis enzimática con α-amilasa y pululanasa, en tampón fosfato a pH 5,2 por 16 horas. Finalizada la incubación se filtra, eliminando el filtrado y lavando el residuo de forma secuencial y sucesiva con etanol absoluto, etanol 85% V-V y acetona. Finalmente el residuo se deseca en estufa.
- **Hidrólisis de los polisacáridos que componen la fibra alimentaria:** La hidrólisis se realiza en dos etapas con ácido sulfúrico. La primera, denominada hidrólisis primaria, se lleva a cabo añadiendo al residuo 2 mL de ácido sulfúrico 12 M y calentando a 35ºC durante 1 hora con agitación. A continuación, la hidrólisis secundaria se lleva a cabo añadiendo 22 mL de agua y calentando a 100ºC durante 2 horas agitando igualmente.
- **Separación y cuantificación de los monosacáridos:** A una alícuota del hidrolizado ácido se añade mio-inositol como patrón interno y los monosacáridos son transformados en acetatos de aditol para su análisis por cromatografía de gases con las siguientes condiciones cromatográficas:
  - Gas portador: Helio
  - Volumen de inyección 25 μL
  - Temperatura del inyector: 250ºC
  - Columna de sílice fundida 30 m x 0.32 mm.
  - Temperatura de la columna: 250ºC
  - Flujo: 1mL/min
  - Detector: Ionización de llama (FID)
  - Temperatura del detector: 275ºC

  El orden de elución de los monosacáridos y el patrón interno, según se indica en la figura, fue: ramnosa, arabinosa, xilosa, m-inositol, manosa, glucosa y galactosa.



A. Discuta cuidadosamente la función de los reactivos, soluciones y operaciones subrayadas.

B. Explique el fenómeno químico físico en el cual se fundamenta la separación cromatográfica y la detección de los azúcares separados.

C. Explique mediante que procedimiento pudieron ser identificados los compuestos cromatografiados.

D. Explique cuidadosamente el procedimiento seguido en este estudio para la cuantificación de los azúcares separados. Tenga en cuenta que solo se realizó otra corrida cromatográfica.

E. Explique qué modificaciones usted introduciría en los parámetros cromatográficos con vistas a disminuir los tiempos de retención de los últimos 4 picos sin afectar la resolución del cromatograma. Fundamente cuidadosamente su respuesta.

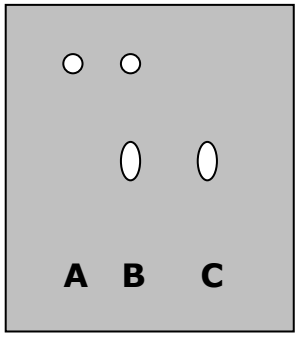
F. Analice las posibles afectaciones que provocarían cada una de las siguientes modificaciones sobre los tiempos de retención, la resolución del cromatograma y el área bajo la curva de los picos obtenidos.

- Utilizar una columna empacada (2 m x 4.2 mm)
- Inyectar 10 μL de muestra
- Emplear una velocidad de flujo de 0,5 mL/min
- Cambiar la temperatura de la columna a 270ºC
- Utilizar un detector de conductividad térmica
- Utilizar un detector de captura de electrones.

G. La determinación del ácido galacturónico, componente principal de las sustancias pécticas, se realiza por un método espectrofotométrico. Para ello se toma una alícuota del hidrolizado ácido y se completa la hidrólisis de las sustancias pécticas por adición de ácido sulfúrico concentrado durante 4 horas a 70ºC. Posteriormente se adiciona 2,5 dimetilfenol y se mide la absorbancia a 450 nm.

- Explique el fundamento del método espectrofotométrico seleccionado incluyendo en su análisis la necesidad de añadir 2,5 dimetilfenol.
- Describa cuidadosamente un procedimiento para realizar la cuantificación del ácido galacturónico.

17. El siguiente cromatograma es el resultado del desarrollo de una cromatografía en capa precubierta activada de Sílica gel HF_{254} (Fluorescente) en la que se aplicaron 10 μL de 3 soluciones (una de muestra y dos de patrones) con el objetivo de conocer la posible degradación del Ergocalciferol (vitamina D_2), el cual brinda como producto de degradación el Ergosterol (compuesto más polar que la vitamina D_2). Para el análisis se utilizó el sistema de solventes: ciclohexano-eter etílico (50:50) y una lámpara UV (254 nm).



A. Identifique la FM y la FE.

B. ¿Que tipo de revelado se utilizó?

C. Mencione el fenómeno físico químico en el cual se basa esta separación y diga como clasifica Ud la cromatografía desarrollada, atendiendo a los objetivos perseguidos.

D. Identifique cada una de las manchas obtenidas en el Cromatograma, justificando cuidadosamente su selección.

18. Para la identificación de aminoácidos en plasma sanguíneo se utiliza la Cromatografía en Capa Delgada de Alta Resolución. Las muestras de sangre se centrifugan y se cromatografía el líquido sobrenadante. Después de un segundo desarrollo con butanol: acetona: ácido acético: agua (35:35:7:23), la placa se sumerge en una solución de Ninhidrina y se calienta posteriormente a 80°C. Para el análisis se utilizaron placas precubiertas de HPTLC de celulosa y patrones de aminoácidos, aplicándose en todos los casos volúmenes de 2 μL.

   A. Explique cuidadosamente el principio cromatográfico que se aplica en este análisis, señalando la Fase Móvil y la Fase Estacionaria.

   B. ¿Qué forma de desarrollo se empleó?

   C. ¿Qué tipo de revelado se utilizó?

   D. ¿Cómo se realiza la identificación requerida en este análisis?

   E. Si Ud quisiera cuantificar el aminoácido Fenilalanina, presente en el plasma sanguíneo, empleando una técnica densitométrica sobre placas de HPTLC, describa cuidadosamente el procedimiento análitico a utilizar para realizar la cuantificación y dibuje aproximadamente los densitogramas resultantes.

19. En un estudio sobre la incidencia de la variedad botánica de la naranja en la calidad nutricional y sensorial de su jugo se trazaron dos objetivos generales:

   - Determinación de la composición y concentración de los azúcares solubles totales presentes en el jugo.

- Determinación de la composición en aceites esenciales y del contenido de cada uno de ellos.

A. Para conocer la composición de los azúcares solubles totales del jugo así como la concentración de cada uno de ellos se realizó una dilución 1:10 de la matriz y se aplicaron los métodos cromatográficos de CCD y HPLC con las siguientes condiciones.

CCD

- Capa de sílicagel (10x20 cm), espesor 0,3 mm
- Fase móvil: nbutanol:ácido acético: agua destilada (8:3:3)
- Volumen de aplicación: 5 μL
- Técnica de desarrollo: Ascendente, hasta 13 cm
- Detección: Rociar uniformemente con solución de ácido tricloroacético-ácido ftálico-ácido p-aminohipúrico en etanol, calentar a 135°C durante 15 minutos.
- Cuantificación: Mediante un densitómetro.

HPLC

- Fase estacionaria: μBondapack (5μm) para análisis de hidratos de carbono en fase normal
- Dimensiones de columna: 20x0.46 cm
- Volumen de inyección: 10 μL
- Velocidad de flujo: 1,5 mL/min.
- Detector: Refractométrico.

Para ambos métodos cromatográficos se preparan soluciones de diferentes concentraciones de patrones de los azúcares.

A-1. Teniendo en cuenta las condiciones de la CCD, explique los pasos dados por el analista para el desarrollo del análisis.

A-2. Si después de desarrollada la CCD se observa que 2 solutos presentes en la muestra no se separaron correctamente, explique 2 variantes que puedan mejorar la resolución del análisis, justificando las condiciones cromatográficas.

A-3. Explique detalladamente cómo se realiza la cuantificación de los azúcares separados por CCD mediante la utilización del densitómetro.

A-4. Explique detalladamente cómo debió realizar el analista la identificación de los azúcares presentes en el jugo cuando aplicó ambos métodos cromatográficos.

A-5. Ambos métodos cromatográficos arrojaron que los azúcares presentes en todos los jugos fueron: sacarosa, fructosa y glucosa y en el análisis por HPLC, los tiempos de retención de los mismos fueron 9.40, 6.73 y 7.48 minutos respectivamente. Con esta información y teniendo en cuenta las condiciones en que se desarrollaron la CCD y la HPLC, ordene de forma creciente cómo serían los valores de los Rf de dichos azúcares en la CCD. Justifique cuidadosamente su respuesta.

B. La composición del aceite esencial y el % de cada componente en el mismo se conocieron con la aplicación de la Cromatografía Gas Líquido. Los análisis arrojaron que, en todos los casos, el limoneno es el componente mayoritario del aceite esencial. Para conocer su concentración en mg/mL se aplicó la vía de cuantificación de patrón interno para lo cual se realizaron 6 corridas cromatográficas adicionales.

B.1. Explique cuidadosamente el procedimiento de cuantificación empleado. Incluya en su análisis el procesamiento estadístico de los resultados y la utilidad que de este procesamiento se deriva.

B.2. ¿Cree Ud acertada la decisión del analista de realizar la cuantificación empleando este procedimiento? Fundamente cuidadosamente su respuesta.

B.3. Mencione 5 condiciones cromatográficas que deben fijarse para la realización del análisis y explique como inciden 3 de ellas en la eficiencia de separación de los componentes de la mezcla en Cromatografía Gas Líquido. Fundamente cuidadosamente su respuesta.

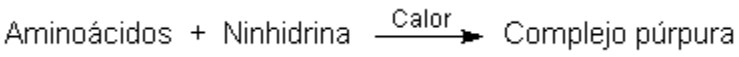
14.2. PROBLEMAS INTEGRADORES

1. En un estudio del valor nutricional del salvado de arroz con vistas a su empleo en la elaboración de productos horneados se desea determinar la composición y concentración de cada uno de los aminoácidos presentes en el producto, para lo cual se decide aplicar el método de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), procediéndose según la siguiente técnica operatoria:

   Pese con exactitud alrededor de 10 g de muestra y determine el % de humedad. A partir de la muestra seca, pese con exactitud una masa que contenga alrededor de 5 mg de proteínas, transfiera cuantitativamente a un tubo de vidrio de 13x100 mm y adicione 4 mL de HCl 6N, colocando el tubo en un sistema adecuado que permita el reflujo durante 24 horas. Posteriormente, evapore a sequedad a 80°C a presión reducida en un rotoevaporador y luego redisuelva con 4 mL de ácido acético al 10%, garantizando que el pH de la solución deberá encontrase entre 2 y 2.5.

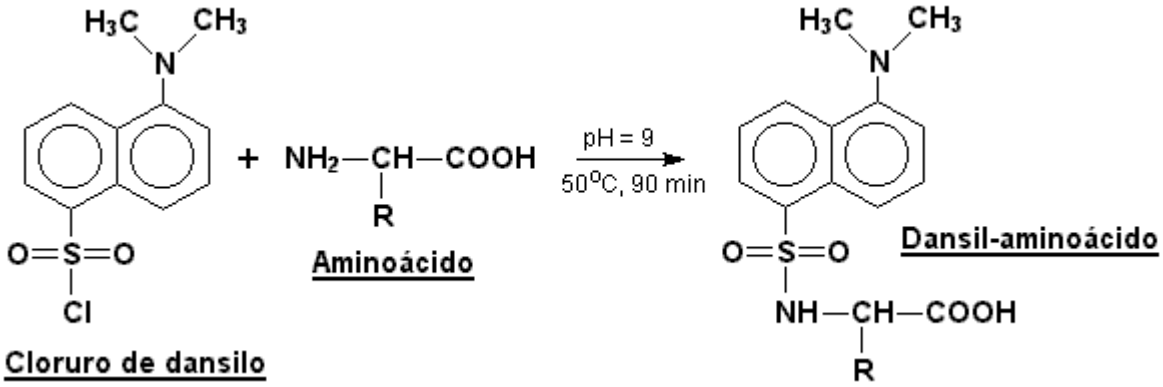
   Transfiera cuantitativamente la muestra redisuelta en ácido acético a una columna empacada con resina Dowex 50 X-8 de intercambio catiónico, previamente tratada (equilibrada) con HCl 1N). Lave la columna, con tres

porciones de 10 mL de cada uno los siguientes solventes: hexano, acetona, metanol y agua desionizada. En cada uno de los eluatos hasta aquí obtenidos efectúe la prueba de la ninhidrina. En ninguno de los casos este ensayo debe dar coloración alguna. Finalmente, eluya los aminoácidos con 10 mL de NH_4OH 7N.



Evapore a sequedad en el rotoevaporador el producto eluido con NH_4OH y redisuelva con 4.5 mL de K_2HBO_3 al 1% a pH= 9. Añada 5 mL de una solución de Cloruro de Dansilo recién preparada, y caliente 90 minutos a 50°C en ausencia de luz, seque en el rotoevaporador y disuelva en 10 mL del diluyente para el producto dansilado (9.8 mL de Metanol grado UV + 0.2 mL de HCl 1N).

La reacción que tiene lugar es la siguiente:



Inyecte 20 μL del producto dansilado en el HPLC, previa filtración por una membrana Milipore con un diámetro de poro de 0.45 micras.

Las condiciones cromatográficas serán las siguientes:

- Columna empacada con Lichrosorb C-18, 5μm (4.6 mm x 250 mm).
- Velocidad de flujo: 1.2 mL/min
- Elución con Acetonitrilo:Agua (3:1)
- Detector ultravioleta a 254 nm.

A. Discuta cuidadosa y detalladamente la función de los reactivos, soluciones, operaciones y condiciones subrayadas.

B. ¿Por qué pudo emplearse un detector UV a una λ= 254 nm para realizar la detección en HPLC? Fundamente cuidadosa y detalladamente su respuesta incluyendo el principio en que se fundamenta la detección, las características espectroscópicas de las especies cromatografiadas y las transiciones energéticas involucradas.

C. Explique cuidadosamente mediante que procedimiento cree Ud que pudieron identificarse los aminoácidos presentes en la mezcla cromatografiada.

D. Explique cuidadosa y detalladamente los pasos que usted daría para realizar la cuantificación de uno de los aminoácidos separados empleando el procedimiento de curva de calibración. Incluya en su análisis el procesamiento matemático de los resultados y la utilidad que de este procesamiento se deriva.

E. Analice las posibles afectaciones (aumenta, disminuye o no se afecta) que provocarían cada una de las siguientes modificaciones sobre los tiempos de retención, la resolución del cromatograma y el área bajo la curva de los picos obtenidos.

- Elución con Tetrahidrofurano:Agua (3:1)
- Elución con Metanol:Agua (2:1)
- Aumentar la velocidad de flujo a 2 mL/min
- Inyectar 30 μL de muestra
- Utilizar una columna empacada con Lichrosorb C-18, 10μm (4.9 mm x 200 mm)
- Utilizar un detector UV a 265 nm.
- Utilizar un detector de índice de refracción

Fundamente cuidadosa y detalladamente sus respuestas. Tenga en cuenta que la polaridad de los solventes más empleados en HPLC es la siguiente: Agua > Metanol > Acetonitrilo > Tetrahidrofurano

F. Proponga un método espectroscópico para determinar la cantidad de Hierro presente en el salvado objeto de estudio. Fundamente su respuesta considerando.

- Fundamento del método y su relación con el componente a cuantificar.
- Preparación de la muestra y objetivo que persigue.
- Procedimiento de cuantificación a través del método del patrón externo explicando por qué es posible aplicar el mismo.

2. El **BIOFORTE**, alimento para regímenes especiales, es un polvo elaborado a partir de sangre entera de cerdo, azúcar, ácido ascórbico y sabor a cola, y se consume como bebida instantánea. Entre las investigaciones realizadas antes de su aprobación para el consumo humano se encuentran:
   - Detección y cuantificación de vitaminas del complejo B
   - Composición en ácidos grasos

La detección y cuantificación de las vitaminas del complejo B, se realizó a partir de un extracto acuoso de las mismas, aplicando HPLC con las siguientes condiciones cromatográficas:

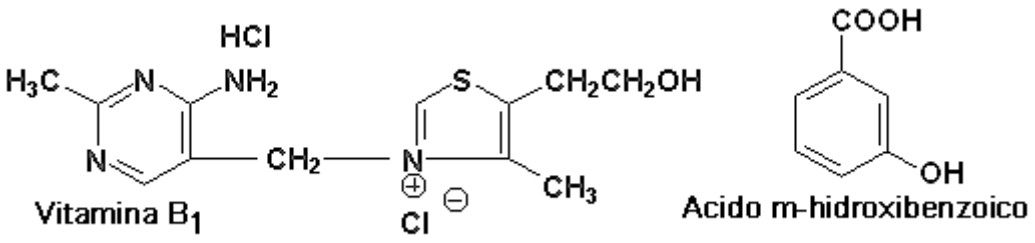
- Columna Nova Pa/2 ODS, 5μm (4.6 mm x 200 mm)
- Fase móvil: Agua: Acetonitrilo: (60: 40)
- Volumen de inyección: 50 μL
- Flujo: 1 mL/min
- Detectores: [1] UV 254 nm

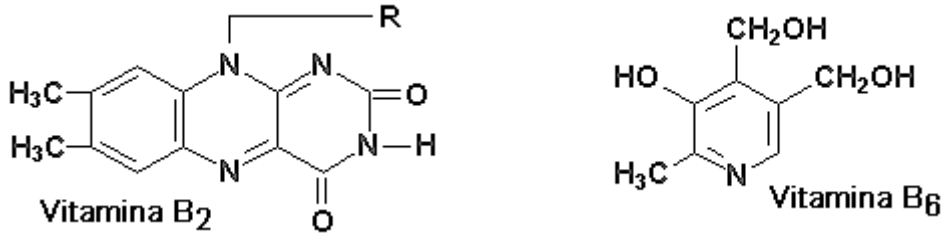
  [2] Fluorométrico (λ excitación= 295 nm, λ emisión= 400 nm)

NOTA: ODS son las siglas de Octadecilsilano (Si-$(CH_2)_{17}$-CH_3)

Al realizar la cromatografía de una mezcla de patrones de B_1, B_2, B_6 y ácido m-hidroxibenzoico como patrón interno (PI); con el detector [1] se obtuvieron 3 picos identificados como B_1, B_2 y PI, y con el detector [2] se obtuvieron solamente 2 picos: B_6 y PI.

A. Justifique cuidadosa y profundamente los resultados obtenidos sobre la base del principio físico químico en que se basa cada detector y las características estructurales de los componentes objeto de análisis, señalando las transiciones energéticas involucradas y teniendo en cuenta además las λ de trabajo en cada caso. Incluya en su análisis la explicación de por qué no se obtuvieron 4 picos en ninguno de los casos.





Los tiempos de retención obtenidos en las corridas cromatográficas para cada componente fueron: B_1 (10 min), B_2 (12 min), B_6 (4 min) y PI (7 min).

B. Organice en orden de polaridad los componentes cromatografiados. Justifique su respuesta sobre la base del principio físico químico que rige la separación y las condiciones cromatográficas empleadas que determinaron el orden de elución.

C. Explique cuidadosa y detalladamente los pasos que usted daría para

realizar la cuantificación de la vitamina B_6 empleando el procedimiento de Patrón Interno. Incluya en su análisis la explicación del procesamiento matemático de los resultados y la utilidad que de este procesamiento se deriva.

D. Si al aplicar HPLC no se obtiene una buena resolución de la mezcla. ¿Cuáles de las siguientes modificaciones pudieran, a su entender, solucionar el problema? Justifique cuidadosamente el efecto de cada una de las nuevas condiciones, aun cuando la misma no mejore la resolución.

- Utilizar una columna empacada con Nova Pa/2 ODS, 10μm (4.6 mm x 150 mm).
- Emplear una velocidad de flujo de 1.5 mL/min.
- Utilizar un detector de índice de refracción.

E. A partir de la grasa extraída al producto se obtuvieron los ésteres metílicos de los ácidos grasos presentes en la misma, los cuales se determinaron por cromatografía gas-líquido. Algunas de las condiciones de trabajo empleadas fueron las siguientes:

- Columna: Dietilenglicol (DEGS) 10% sobre Cromosorb WHP 80-100 mesh, 2,7 m x 1,5 mm
- Gas portador: N_2
- Temperatura del detector: 200 ºC
- Volumen de inyección: 10 μL

E.1. Señale tres condiciones cromatográficas que no hayan sido informadas anteriormente, argumentando por qué es necesario conocer las mismas sobre la base de su función e incidencia en los resultados.

E.2. Explique a través de qué procedimiento puede identificarse la presencia de ácido butírico en la mezcla cromatografiada.

3. La Norma ISO 10727 de 1995 establece para conocer el contenido de cafeína del té, su determinación por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC), con previa extracción del analito a partir de la matriz molida y en presencia de MgO. Posteriormente se filtra y se realiza una dilución para obtener la solución de muestra a cromatografiar, que en muchos casos puede presentar también mínimas cantidades de otros alcaloides.

   Las condiciones cromatográficas que establece esta norma son las siguientes:

   - Columna: Nucleosic C-18
   - Sistema de solventes: metanol:agua (1:4). Regimen isocrático
   - Volumen de inyección: 10 μL

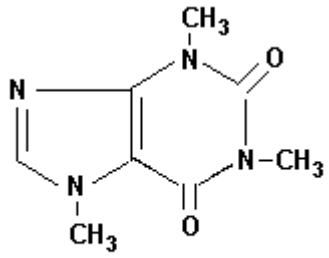
- Velocidad de flujo: 1 mL/min
- Detector UV 254 nm

También es conocido que la solución del analito puede ser analizada por Cromatografía en Capa Delgada (CCD) empleando las siguientes condiciones:

- Capa de sílicagel F-254 (no activada)
- Sistema de solventes: butanol: acetona: cloroformo: amoníaco 12.5 M (4:3:3:1)
- Volumen de aplicación: 10μL
- Detección: UV 254

A. Explique el fenómeno físico químico en el cual se fundamenta la separación de los alcaloides en una de las dos técnicas arriba descritas.

B. Justifique cuidadosamente por qué se pudo emplear un detector UV para realizar la detección de la cafeína por HPLC. Apóyese en la estructura de este alcaloide y en sus características espectroscópicas.



Cafeina

C. Explique el fenómeno físico químico en el cual se fundamenta la detección de los alcaloides separados por la técnica de Cromatografía en Capa Delgada (CCD).

D. Un analista aplica ambas técnicas (HPLC y CCD) y logra separar 3 componentes, obteniendo los siguientes resultados:

HPLC: **Tiempos de retención:** Alcaloide 1 > Alcaloide 2 > Cafeína

Areas: Cafeína >> Alcaloide 1 > Alcaloide 2

CCD: **Rf:** Alcaloide 1 > Alcaloide 2 > Cafeína

Absorbancias: Cafeína >> Alcaloide 1 > Alcaloide 2

En ambas técnicas se trabajó, cuando fue necesario, con patrones de los tres alcaloides.

D.1. Justifique la necesidad de trabajar con patrones en ambas técnicas cromatográficas.

D.2. Teniendo en cuenta las condiciones de trabajo empleadas en ambas técnicas cromatográficas y el mecanismo de separación que se

manifiesta en cada una de ellas, fundamente cuidadosamente el hecho de que para la cafeína se obtengan los menores valores de tiempos de retención y Rf.

D.3. Dibuje los cromatogramas obtenidos para cada caso identificando en cada uno de ellos los alcaloides separados.

D.4. Explique cuidadosamente una vía de identificación y cuantificación de la cafeína por ambos métodos. Incluya los pasos que deben seguirse y el procesamiento de los resultados.

D.5. Si se desea cuantificar la cafeína por CCD empleando una técnica densitométrica, ¿a qué valor de λ debe realizarse el análisis? Justifique su respuesta.

E. Si Ud está participando en una investigación sobre un nuevo producto descafeinado y necesita establecer una técnica analítica para comprobar la ausencia de cafeína en el alimento en estudio. Proponga un método instrumental que permita dar respuesta a esta problemática. Justifique su propuesta y explique cómo interpretaría los resultados obtenidos con su aplicación que le permitieran concluir acerca de la presencia o no de cafeína en el producto.

4. Un estudio de caracterización de mieles monoflorales procedentes de diferentes regiones de Cuba, se realizó a través de la medición de los siguientes parámetros:

- Contenido total de azúcares solubles
- Composición de los azúcares solubles totales y concentración de cada uno de ellos.
- Determinación de los compuestos volátiles.
- Determinación de acidez total valorable.
- Contenido de micronutrientes (K, Ca, Na, Fe, Zn y Cu).

A. El contenido de azúcares solubles totales se determinó por el método de antrona-H_2SO_4. Una alícuota del extracto acuoso de azúcares obtenidos a partir del jugo se hace reaccionar con 5 mL de la solución de antrona-H_2SO_4 manteniendo en ebullición durante 12 minutos las soluciones. La absorbancia se lee en la zona del visible. Para la cuantificación se utiliza la ecuación $y= 1.142\ X - 0.457$ con un $R^2= 0.9999$ obtenida de una curva de calibración de glucosa patrón. El valor de la pendiente y del intercepto resultó estadísticamente significativo.

A-1. Para determinar experimentalmente la λ de trabajo, el analista posee una solución de muestra preparada a partir del jugo y 3 soluciones patrones de concentración 0.02, 0.05 y 0.07 mg glucosa/mL las cuales se procesaron por la técnica de la antrona-H_2SO_4. ¿Cuál o

cuáles de las soluciones anteriores pueden utilizarse para dicha determinación?. Justifique su respuesta.

A-2. ¿Explique cómo procedería el analista para determinar experimentalmente la λ de trabajo?

A-3. ¿Cree Ud acertada la decisión del analista de realizar la cuantificación de los azúcares por la ecuación expresada? Fundamente cuidadosamente su respuesta.

B. Para conocer la composición de los azúcares solubles totales las mieles así como la concentración de cada uno de ellos se realizó una dilución 1:20 de la matriz y se aplicaron los métodos cromatográficos de CCD y HPLC con las siguientes condiciones.

CCD

- Capa de sílicagel tipo amino (10x20 cm), espesor 0,3 mm
- Fase móvil: nbutanol:ácido acético: agua destilada (8:3:3)
- Volumen de aplicación: 5 μL
- Técnica de desarrollo: Ascendente, hasta 13 cm
- Detección: Rociar uniformemente con solución de ácido tricloroacético-ácido ftálico-ácido p-aminohipúrico en etanol, calentar a 135°C durante 15 minutos.
- Cuantificación: Mediante un densitómetro.

HPLC

- Fase estacionaria: μBondapack (5μm) para análisis de hidratos de carbono en fase normal
- Dimensiones de columna: 20 x 0.46 cm
- Volumen de inyección: 10 μL
- Velocidad de flujo: 1,5 mL/min.
- Detector: Refractométrico.

Para ambos métodos cromatográficos se preparan soluciones de diferentes concentraciones de patrones de los azúcares.

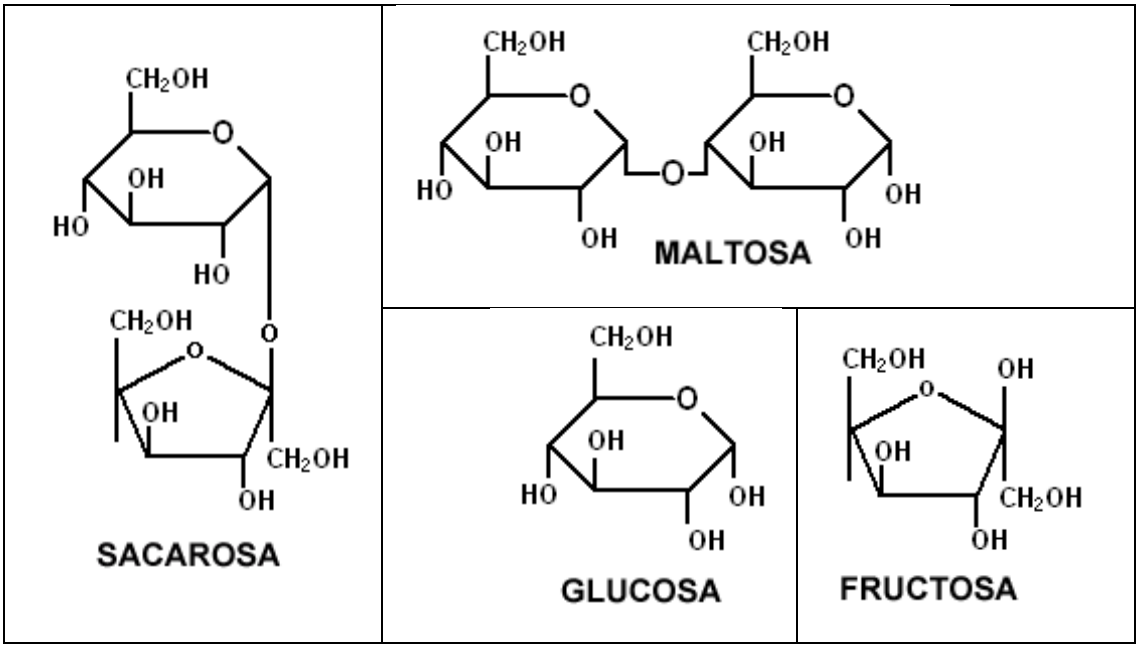
B.1. Explique detalladamente cómo debió realizar el analista la identificación de los azúcares presentes en el jugo cuando aplicó ambos métodos cromatográficos.

B.2. Ambos métodos cromatográficos arrojaron que los azúcares presentes en todos las mieles fueron: sacarosa, fructosa, maltosa y glucosa y en el análisis por HPLC, los tiempos de retención de los mismos fueron 9.40, 6.73, 10.05 y 7.48 minutos respectivamente.

Con esta información y teniendo en cuenta las condiciones en que se desarrollaron la CCD y la HPLC, ordene de forma creciente cómo serían los valores de los Rf de dichos azúcares en la CCD. Justifique cuidadosamente su respuesta y organice en orden de polaridad los azúcares identificados.

B.3. Explique detalladamente cómo se realiza la cuantificación de los azúcares separados por CCD mediante la utilización de un densitómetro.

B.4. ¿Pudiera utilizarse un detector UV-Visible de λ variable para realizar la detección de los azúcares por HPLC? Fundamente cuidadosamente su respuesta teniendo en cuenta el principio en que se fundamenta esta detección, las estructuras de las sustancias, sus características espectroscópicas y las transiciones energéticas involucradas.



C. El análisis de los compuestos volátiles presentes en la miel se realizó por un método de cromatografía de gases a través del siguiente procedimiento.

Extracción de los volátiles: Los volátiles fueron extraídos de 1 g de miel en 4 mL de agua, aplicando la técnica de Microextracción en Fase Sólida (SPME) con espacio de cabeza, empleando fibras de Polidimetilsiloxano/divinilbenceno (PDMS/DVB).

Condiciones cromatográficas:

- Columna de sílice fundida (HP-5MS) de difenil dimetilpolisiloxano (30 m x 0.25 mm).
- Gas portador: Helio

- Flujo: 1 mL/min
- Inyección splitless
- Temperatura del inyector: 250ºC
- Temperatura del horno: El horno se programó a 50ºC por 4 min e incrementó hasta 200ºC a 10ºC/min, se mantuvo a esta temperatura durante 0.5 min y se incrementó nuevamente hasta 230ºC a razón de 20ºC/min manteniéndose en esta última durante 1 minuto.
- Detector: Espectrómetro de masas a 230ºC.

Mediante la aplicación de esta técnica se separaron 35 compuestos volátiles, de los cuales se identificaron y cuantificaron 29.

C.1. Explique cuidadosamente en que consiste el procedimiento de extracción de los compuestos volátiles empleado en este estudio.

C.2. Teniendo en cuenta las condiciones cromatográficas empleadas, mediante qué procedimiento pudieron identificarse los 29 compuestos señalados.

C.3. ¿Qué modo de operación se empleó para la separación cromatográfica y por qué cree usted que fue necesario utilizarlo?

C.4. La cuantificación de los compuestos volátiles se realizó por el procedimiento de patrón interno empleando alcohol bencílico para estos fines y calculando el factor de respuesta para cada componente. ¿Cree Ud acertada la decisión del analista de realizar la cuantificación empleando este procedimiento? Fundamente cuidadosamente su respuesta y explique el procedimiento empleado.

C.5. Mencione 3 condiciones cromatográficas que inciden en la eficiencia de la separación de los componentes de la mezcla en Cromatografía Gas Líquido. Fundamente cuidadosamente su respuesta.

D. La determinación de acidez total valorable se determinó por peahimetría, realizando una valoración con NaOH 0.5 N utilizando un pHmetro con electrodos de vidrio y calomel. Explique detalladamente el procedimiento para llegar a obtener el % de acidez en las mieles analizadas.

E. Los contenidos de Fe, Cu y otros elementos se determinaron por Espectrometría de Absorción Atómica.

E.1. Proponga y explique un procedimiento de preparación de la muestra para realizar dichos análisis.

E.2. Explique detalladamente por qué es necesaria la presencia en el equipo de una lámpara de cátodo hueco constituida por el mismo elemento que se analiza.

E.3. La cuantificación de cada uno de los elementos se realizó empleando una curva de calibración y una curva de adición de patrón. Los resultados obtenidos por ambas vías fueron los siguientes:

Curva de calibración: y= 0,0057x + 0,0433 R^2= 0,9983

Curva de adición de patrón: y= 0,0057x + 0,6342 R^2= 0,9978

¿A qué conclusiones pueden arribarse sobre la base de estos resultados? ¿Qué procedimiento elegiría usted emplear en el futuro? Fundamente cuidadosamente sus respuestas.

14.3. ANÁLISIS DE DOCUMENTACIÓN CIENTÍFICA

1. Estudie cuidadosamente el artículo *"Determinación de polisacáridos totales en gel líquido de Aloe Vera L, para su empleo como materia prima en formulaciones de suplementos dietéticos"*, que aparece en el ***Capítulo 15 / epígrafe 15.1***, y resuelva las siguientes tareas docentes:

   1.1. Identifique los parámetros de calidad evaluados en el trabajo y realice un resumen que incluya la definición y los objetivos que se persiguen con su evaluación.

   1.2. Explique en qué consiste el método de adición de patrón empleado en este estudio para la evaluación de la exactitud del método.

   1.3. Explique cómo se realizó el estudio de la especificidad y que información brinda la metodología empleada en este estudio.

   1.4. ¿Qué importancia reviste en este trabajo el estudio de la estabilidad del complejo formado?

   1.5. ¿Por qué cree usted que no se realizó una evaluación de los parámetros límite de detección y límite de cuantificación para el método empleado en la cuantificación?

   1.6. Explique con qué objetivo se se adiciona 1 mL de solución de fenol al 5% y 5 mL de ácido sulfúrico concentrado, a la disolución de aloe tomada como porción de ensayo. Investigue las reacciones químicas que tienen lugar.

   1.7. Explique por qué se realizan las lecturas de absorbancia a una longitud de onda de 490 nm y como pudo ser determinado en la práctica este valor.

   1.8. Para la realización de la curva de calibración se empleó un estándar de D(+) manosa, suministrado por la firma Merck, por ser este el monómero mayoritario en el polisacárido de la especie cubana. ¿Podría haberse empleado un estándar de D(+) glucosa? Fundamente cuidadosamente su respuesta.

1.9. Realice una valoración crítica del trabajo sobre la base de la correspondencia entre los objetivos propuestos, la metodología empleada para su cumplimiento, la discusión de los resultados obtenidos y las conclusiones a las que se arriban.

2. Estudie cuidadosamente el artículo *"Leche fluida y yogur natural enriquecidos con hierro"*, que aparece en el ***Capítulo 15 / epígrafe 15.2***, y resuelva las siguientes tareas docentes:

   2.1. Investigue que diferencias que existen entre el hierro ferroso y el hierro férrico, desde el punto de vista de la absorción y asimilación por el organismo humano.

   2.2. Explique por qué cree usted que se decidió cuantificar el hierro total por un método de absorción atómica y el hierro ferroso por el método espectrofotométrico con 1 y 10-fenantrolina. Investigue las reacciones químicas que tienen lugar en este último procedimiento y por qué puede utilizarse ese método para la cuantificación de hierro ferroso. ¿Cree usted que pudiera haberse determinado el hierro ferroso por espectrometría de absorción atómica?

   2.3. ¿Qué importancia reviste en este estudio la determinación del índice del ácido tiobarbitúrico (TBA)? Fundamente cuidadosamente su respuesta e investigue el principio en que se basa esta determinación.

   2.4. Explique el fundamento del método del molibdovanadato empleado para la determinación de fósforo. Incluya en su análisis las reacciones químicas involucradas y las transiciones energéticas que tienen lugar.

   2.5. Por qué cree usted que fue necesario incluir en este estudio la evaluación sensorial de los productos utilizando un panel de catadores adiestrados. Investigue en que consiste esta evaluación.

   2.6. Realice una valoración crítica del trabajo sobre la base de la correspondencia entre los objetivos propuestos, la metodología empleada para su cumplimiento, la discusión de los resultados obtenidos y las conclusiones a las que se arriban.

3. Estudie cuidadosamente el artículo *"Caracterización analítica de alginato de sodio"*, que aparece en el ***Capítulo 15 / epígrafe 15.4***, y resuelva las siguientes tareas docentes:

   3.1. Investigue y explique el procedimiento seguido para la determinación del peso molecular del alginato de sodio por cromatografía de filtración sobre gel. Apóyese para su análisis en los siguientes aspectos:

   - Fundamento físico químico general en el que se basa la cromatografía de filtración sobre gel.
   - ¿En qué consiste la calibración de la columna cromatográfica?

- ¿Qué significa que el volumen de exclusión y el volumen total fueron calculados a partir de los volúmenes de elución de la dextrana T2000k y la glucosa respectivamente?
- ¿Qué relación existe entre el coeficiente de partición (K_{av}) y el peso molecular de los patrones y las muestras de alginato cromatografiados?
- ¿Por qué cree usted que se empleó un detector de índice de refracción? ¿Podría haberse empleado un detector UV de λ variable?

3.2. Investigue y explique el procedimiento seguido para la determinación de la relación ácido manurónico / ácido gulurónico (Relación M/G). Apóyese para su análisis en los siguientes aspectos.

- Fundamento físico químico general en que se basa la cromatografía de intercambio iónico
- ¿Por qué se emplea en este análisis una resina de intercambio aniónico?
- ¿Qué procedimiento de elución se empleó?
- ¿Cómo se recogieron los eluatos?
- ¿Cómo se realizó la detección de los ácidos urónicos separados?
- Explique el significado del siguiente fragmento: *"Las fracciones positivas frente al orcinol correspondientes a cada uno de los ácidos urónicos se mezclaron y se cuantificaron con ayuda de una curva de calibración empleando un patrón de ácido glucurónico".*
- Explique por qué cree usted que los resultados obtenidos para la fracción correspondiente al ácido gulurónico se multiplicaron por un factor de conversión igual a 0.66 teniendo en cuenta la destrucción preferencial del ácido manurónico durante la hidrólisis.

3.3. Realice una valoración crítica del trabajo sobre la base de la correspondencia entre los objetivos propuestos, la metodología empleada para su cumplimiento, la discusión de los resultados obtenidos y las conclusiones a las que se arriban.

4. Estudie cuidadosamente el artículo *"Validación de un método para la determinación de patulina en jugos y purés de frutas por HPLC"*, que aparece en el ***Capítulo 15 / epígrafe 15.5***, y resuelva las siguientes tareas docentes:

4.1. Identifique los parámetros de calidad evaluados en el trabajo y realice un resumen que incluya la definición y los objetivos que se persiguen con su evaluación.

4.2. Explique cuidadosamente cómo cree usted que se realizaron los estudios de repetibilidad y exactitud del método propuesto.

4.3. ¿Por qué cree usted que fue necesario evaluar el límite de detección y el límite de cuantificación del método propuesto?

4.4. Explique mecanismo físico químico en que se fundamenta la separación de la patulina en la columna cromatográfica utilizada.

4.5. Por qué cree usted que pudo utilizarse un detector UV para realizar la detección de la patulina. Incluya en su análisis la estructura de la micotoxina y las transiciones energéticas involucradas.

4.6. Realice una valoración crítica del trabajo sobre la base de la correspondencia entre los objetivos propuestos, la metodología empleada para su cumplimiento, la discusión de los resultados obtenidos y las conclusiones a las que se arriban.

5. Estudie cuidadosamente el artículo *"Análisis de los compuestos volátiles del tomate de árbol (Cyphomandra betacea Sendtn.) mediante microextracción en fase sólida"*, que aparece en el ***Capítulo 15 / epígrafe 15.8***, y resuelva las siguientes tareas docentes:

5.1. Explique cuidadosamente en que consiste el procedimiento de extracción de los compuestos volátiles empleado en este estudio.

5.2. ¿Por qué cree usted que fue necesario realizar pruebas preliminares con la fibra de PDMS estudiando la temperatura y tiempo de extracción? Fundamente su respuesta sobre la base del efecto de estos factores en la extracción.

5.3. Identifique el tipo de columna utilizada en el estudio y explique por qué cree usted que se seleccionó la misma atendiendo a los objetivos del estudio y a la eficiencia de este tipo de columna.

5.4. Explique por qué cree usted que se empleó el programa de temperatura descrito en este estudio.

5.5. Explique en que consiste el método de cuantificación empleado en este estudio y la razón que llevó a los investigadores a seleccionarlo. Sobre la base de su respuesta, ¿qué ventajas y desventajas tendría el empleo del método del patrón interno?

5.6. Realice una valoración crítica del trabajo sobre la base de la correspondencia entre los objetivos propuestos, la metodología empleada para su cumplimiento, la discusión de los resultados obtenidos y las conclusiones a las que se arriban.

15 Aplicaciones de los métodos instrumentales en la investigación científica

En el presente capítulo se relacionan de forma íntegra 10 artículos científicos publicados en revistas nacionales e internacionales entre los años 1995 y 2010 y constituye, a nuestro juicio, una parte especial de este texto, por lo que consideramos necesario realizar algunos comentarios con vistas a facilitar su estudio y centrar la atención del lector en determinados aspectos que consideramos de interés.

La aplicación los métodos de análisis químico e instrumental es vital para el control de calidad y para la caracterización físico química de un producto. Los trabajos *"Caracterización analítica de alginato de sodio" (epígrafe 15.4)*, *"Análisis de los compuestos volátiles del tomate de árbol (Cyphomandra betacea Sendtn.) mediante microextracción en fase sólida" (epígrafe 15.8)* y *"Método de microextracción en fase sólida para el análisis de compuestos volátiles en cervezas" (epígrafe 15.9),* son ejemplos muy representativos. En el primero de los trabajos mencionados se requiere del empleo de varios métodos instrumentales para cumplimentar los objetivos (cromatografía en columna convencional de intercambio iónico, cromatografía automatizada de filtración sobre gel, espectroscopia infrarrroja, espectrometría de absorción molecular y atómica, entre otros), mientras que en los dos últimos artículos la cromatografía de gases es la herramienta analítica empleada.

Usualmente se tiende a circunscribir la aplicación los métodos de análisis químico e instrumental casi únicamente hacia los objetivos de caracterización arriba mencionados, sin embargo, existen otras muchas investigaciones donde la química analítica tiene un papel protagónico.

Así por ejemplo, los trabajos *"Determinación de polisacáridos totales en gel líquido de Aloe vera L, para su empleo como materia prima en formulaciones de suplementos dietéticos" (epígrafe 15.1), "Validación de un método para la determinación de patulina en jugos y purés de frutas por HPLC" (epígrafe 15.5)* y *"Validación de un método por Cromatografía de Gases para la determinación de los ácidos grasos que componen el D-004 ingrediente activo" (epígrafe 15.10),* describen procedimientos de validación; el primero empleando la espectrometría de absorción molecular UV-Vis, el segundo mediante cromatografía líquida de alta resolución como herramienta para determinación de sustancias tóxicas y el tercero usando la cromatografía de gases para el estudio de sustancias anticancerígenas. En todos los casos, objetivo de estas investigaciones es precisamente ayudar a establecer las características de funcionamiento de un método analítico para su aplicación en la cuantificación de un determinado analito.

Por otra parte, el trabajo "*Leche fluida y yogur natural enriquecidos con hierro" (epígrafe 15.2)*, muestra el importante papel de la química analítica en la evaluación de la efectividad de nuevas formulaciones de productos tradicionales con vistas a elevar el valor nutricional de determinados alimentos. En este caso dicha evaluación se realiza a través de la espectrometría de absorción atómica.

Otro importante campo de aplicación de la química analítica es la evaluación de la efectividad de nuevos métodos de conservación y en este sentido, el trabajo *"Desinfestación del frijol de soja por irradiación" (epígrafe 15.3)*, constituye un excelente ejemplo. Es por ello que a pesar de ser una investigación publicada hace más de 15 años se ha seleccionado para formar parte de este capítulo. Otro elemento interesante se esta investigación es el hecho de que la gran mayoría de los métodos empleados son clásicos (volumetría y gravimetría), lo que demuestra la pertinencia de estos métodos para cumplimentar los objetivos de una investigación, siempre y cuando estén bien seleccionados y empleados.

El trabajo "*Carotenoides séricos y su relación con la dieta en un grupo de adultos cubanos" (epígrafe 15.6)*, persigue como objetivo relacionar el perfil de carotenoides presentes en la sangre con la ingesta dietética de un grupo de adultos cubanos aparentemente sanos. Cabe señalar que en esta investigación la matriz no es un alimento sino un fluido biológico y la cromatografía líquida de alta resolución es el método seleccionado para la determinación.

Objetivos bien diferentes se ponen de manifiesto en el trabajo *"Ocurrencia de Aflatoxina M_1 en leches cruda, ultrapasteurizada y orgánica producidas y comercializadas en el altiplano mexicano" (epígrafe 15.7)*. El método analítico sirve ahora como una herramienta de evaluación nutricional para determinar la presencia de sustancias nocivas al hombre (aflatoxinas en este caso) en un alimento de alto consumo.

Nos parece importante también, que el lector centre su atención en el hecho de que en la mayoría de estos trabajos, el análisis químico cuantitativo no es la única herramienta utilizada para alcanzar los objetivos propuestos sino que se requiere del conocimiento y aplicación de otras ciencias específicas como la nutrición, la química de los alimentos, la tecnología de los alimentos y la estadística, así como de otras herramientas de evaluación como el análisis entomológico y el análisis sensorial, por solo citar algunos ejemplos. Quiere esto decir que la investigación de hoy en día tiene un carácter multidisciplinario, lo que requiere del concurso de varios especialistas que trabajen en equipo. Solo así ha sido posible alcanzar el desarrollo científico tecnológico del presente y cada día este trabajo en equipo se hace más necesario.

Finalmente queremos hacer alusión a algunos elementos formales en la redacción de un artículo de investigación científica. Si bien existe un formato más o menos común (título, resumen, introducción, materiales y métodos, resultados y discusión, conclusiones y bibliografía), y cualquier trabajo de esta índole debe caracterizarse por un elevado rigor científico y objetividad de las ideas y de los

resultados que se exponen, se evidencia en la práctica científica, flexibilidad en los estilos de redacción y en el reporte de los métodos utilizados y la bibliografía consultada. Así, en algunos trabajos se describe con más detalle el procedimiento analítico empleado y en otros solo se citan las referencias. Lo mismo ocurre con la bibliografía consultada que, en algunos trabajos se relaciona en orden alfabético y en otros en orden de aparición.

Con respecto a las referencias bibliográficas, con independencia de la norma que se adopte para exponerlas, éstas deben contener los apellidos de los autores, el título de la fuente consultada y el año de publicación, con vistas a que los investigadores interesados puedan consultar estas fuentes. Debe señalarse que en algunos de los artículos contenidos en este capítulo no se relaciona la totalidad de la bibliografía consultada en cada uno de los trabajos puesto que en muchos casos es muy extensa y el objetivo que se persigue no es el de constituir una fuente de referencia.

El objetivo central de este capítulo es que el lector se ponga en contacto con ejemplos concretos que reafirman la enorme importancia de los métodos de análisis químico e instrumental, como una poderosa herramienta para la resolución de problemáticas de investigación actuales en el campo de los alimentos y valore las diferentes vertientes investigativas en las que los métodos de análisis juegan un papel protagónico al tiempo que comience a familiarizarse con los métodos de investigación científica en el campo de los alimentos.

Finalmente debe señalarse que todos los artículos recogidos en este apartado cuentan con la autorización de sus autores.

15.1. DETERMINACIÓN DE POLISACÁRIDOS TOTALES EN GEL LÍQUIDO DE ALOE VERA L, PARA SU EMPLEO COMO MATERIA PRIMA EN FORMULACIONES DE SUPLEMENTOS DIETÉTICOS.

E. A. Rodríguez, J. E. Rodríguez, Z. Pardo y V. Pavón

Centro de Investigaciones y Desarrollo de Medicamentos (CIDEM). Ministerio de Salud Pública. Cuba.

Fuente: *Revista Alimentaria No 313. Junio 2000. Madrid. España.*

RESUMEN

Aloe Vera L, es una planta utilizada en nuestro país para el tratamiento de diversas enfermedades y en la elaboración de diferentes productos empleados en la industria de los cosméticos y como suplementos dietéticos. Es conocido que los mismos presentan derivados antraquinónicos, polisacáridos, ácidos orgánicos, proteínas y minerales.

En la actualidad se ha desarrollado un proceso tecnológico para la obtención de gel líquido de aloe, el cual es rico en polisacáridos, para su empleo como suplemento dietético.

En este trabajo se elaboró un método de análisis para la cuantificación del contenido de polisacáridos en el gel, el cual se validó según las exigencias actuales. Los resultados mostraron que el método propuesto cumple con los parámetros de especificidad, precisión, exactitud y linealidad.

INTRODUCCIÓN

Aloe vera L., comúnmente conocido en Cuba como "sábila", es una planta ampliamente utilizada por la población para el tratamiento de diversas enfermedades. A ella se le atribuyen propiedades cicatrizantes, laxativas, antiasmáticas, antihepatotóxicas, antiblenorrágicas y antiescorbúticas, entre otras (1-6).

Su composición química puede variar de una especie a otra, dependiendo de muchos factores. No obstante, de manera general se conoce que el Aloe presenta en su composición derivados antraquinónicos (Aloína, Homonataloína y Aloemodina, entre otros), polisacáridos (compuestos por Arabinosa, Galactosa, Manosa, Ramnosa y Glucosa, entre otros), ácidos orgánicos, proteínas y minerales. Por su alto y variado contenido de nutrientes naturales, se emplea además, como complemento de dietas bajas en calorías, aportando la energía necesaria contra desgastes físicos (2, 5, 7-13).

En nuestro centro se ha desarrollado un proceso tecnológico para la obtención de gel líquido de Aloe, el cual será empleado como materia prima en el desarrollo de diferentes formulaciones para utilizarse como suplementos nutricionales y farmacéuticos. Con el objetivo de establecer el control de calidad de dicha materia prima, se ha desarrollado un método de análisis por espectrofotometría ultravioleta visible, basándose en la propiedad que presentan los polisacáridos de formar furfural, por hidrólisis y posterior deshidratación de estos en presencia de

ácido sulfúrico, que al reaccionar con fenol forma un complejo de color amarillo naranja que presenta un máximo de absorción a 490 nm (14).

MATERIALES Y MÉTODOS

La metodología establecida fue la siguiente: Se pasa 1 mL de gel líquido de Aloe a un matraz aforado de 100 mL, llevándose a volumen con solución de cloruro de sodio 0.3 mol/L. Posteriormente se toman 2 mL de esta solución y se llevan a un tubo para ensayo, se adiciona 1 mL de solución de fenol al 5% y 5 mL de ácido sulfúrico concentrado, se agita y se deja en reposo por 30 minutos. La absorbancia se determina a 490 nm.

Se utilizó muestra correspondiente al lote 98002 del gel, elaborado por el Departamento de Productos Naturales de nuestro centro. Como estándar de referencia se empleó la D(+) manosa, suministrado por la firma Merck, por ser este el monómero mayoritario en el polisacárido de la especie cubana (15).

Se elaboró una curva de calibración cuyas concentraciones oscilaron entre 10 y 120 ppm de manosa, siguiendo para ello el mismo procedimiento descrito anteriormente.

Previamente se realizó un estudio para establecer la estabilidad del complejo formado. Para ello se determinó el valor de la absorbancia del complejo a intervalos de 10 minutos, entre los 20 y 70 minutos después de formado el mismo.

Con el objetivo de definir la especificidad del método propuesto se realizó la precipitación de los polisacáridos presentes en la muestra según la metodología descrita por Quevedo (15). Posteriormente se realizó la metodología de análisis a las muestras de polisacárido precipitado, del gel líquido de Aloe y del líquido sobrenadante, determinándose el espectro de absorción en la zona del visible.

Para determinar la precisión del método se realizaron 7 determinaciones por un analista y 6 determinaciones por otro analista, en días diferentes a una misma muestra de gel líquido de Aloe. Se calculó la media, la desviación estándar y el coeficiente de variación para cada caso y los resultados se compararon entre si mediante un test de Fisher y un test t de Student (16-18).

Para el estudio de la exactitud se aplicó el método de adición de estándar. Se preparó una solución madre de 20 ppm de manosa y se prepararon muestras a las cuales se adicionaron concentraciones conocidas de manosa de 2, 4 y 6 ppm. Posteriormente se realizó la metodología de análisis establecida.

Para evaluar el parámetro de linealidad se realizó la curva de recobrado, determinándose la ecuación de la recta por el método de los mínimos cuadrados.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se obtuvo una curva de calibración del tipo y = 0.0068X - 0.038, con un coeficiente de determinación de 0.998, la cual cumple con la ley de Lambert Beer. Los factores de respuesta son similares entre sí y cercanos al valor de la

pendiente, y su coeficiente de variación es inferior al 5%. La pendiente de la recta de regresión tiene un 95% de probabilidad de ser diferente de cero (t_{exp}=37.99 > t_{tab}=2.45), según el procesamiento estadístico realizado a la misma, mientras que el intercepto es próximo a cero (t_{exp}=2.04 < t_{tab}=2.45) (16-18).

El estudio para establecer la estabilidad del complejo formado demostró que no existían diferencias significativas entre los resultados obtenidos a los 20 minutos y cada una de las mediciones realizadas a cada uno de los intervalos, por lo que las mediciones pueden ser realizadas durante el período de tiempo estudiado.

Los estudios de especificidad del método demostraron que se obtienen máximos de absorción a 490 nm, característicos del complejo que se forma entre el polisacárido y el fenol sulfúrico para los dos primeros casos, no observándose ninguna absorción en esa zona en el caso de la muestra de líquido sobrenadante. Estos resultados son importantes pues se confirma que la metodología establecida es específica para la determinación de polisacáridos totales, no formando complejos con el resto de los componentes presentes en el gel.

Los resultados del estudio de la precisión del método (tabla 1), demuestran que en ambos casos el coeficiente de variación para cada analista es menor que el 3%, lo que se considera adecuado para este tipo de análisis según la literatura consultada (16-17). Por otro lado no se encontraron diferencias significativas entre las medias de los resultados y las varianzas de cada analista (F_{exp}=2.678 < F_{tab}=4.39, t_{exp}=0.38 < t_{tab}=2.18 para p=0.05 y GL=12), por lo que se puede considerar la muestra como homogénea.

Tabla 1.

Resultados del estudio de precisión.

	n	Valor medio (%)	Desviación estándar	Coeficiente de variación (%)
Analista 1	7	0.384	0.0074	1.94
Analista 2	6	0.386	0.0112	2.90

Media general= 0.368 (n=14)
Desviación estándar= 0.0084
Coeficiente de variación= 2.17%

Los resultados del estudio de la exactitud del método (tabla 2) demostraron que en todos los casos los porcentajes de recobrado están entre el 97 y el 103%, siendo el recobrado promedio de 101.03% y el coeficiente de variación de 1.59%, lo que consideramos adecuado para este tipo de análisis.

La determinación de la G de Cochran (G_{exp}=0.5825 < G_{tab}=0.8709), demostró que las varianzas de las concentraciones empleadas son equivalentes, pudiéndose asumir que la concentración no influye en la variabilidad de los resultados. Se comprobó además que no existían diferencias significativas entre

el valor de la recuperación media y el 100% de recobrado (t_{exp}=0.22 < t_{tab}=2.31 para p=0.05 y GL=8) (16-18).

Tabla 2.

Resultados del estudio de exactitud.

n	ppm teóricos	ppm prácticos	% de recobrado
3	2.00	1.98	99.20
3	4.00	4.09	102.2
3	6.00	6.1	101.7

% de recobrado medio= 101.03 (n=3)
Desviación estándar= 1.6072
Coeficiente de variación= 1.59%

Al evaluar la linealidad del método, se obtuvo una recta del tipo y= mX + b (y= 1.03X - 0.063 con R^2=0.999), siendo significativa la pendiente y no significativo el intercepto, según los test estadísticos realizados.

CONCLUSIONES.

Como conclusiones de este trabajo podemos afirmar que el método propuesto es más sencillo y rápido que el método tradicional por gravimetría, quedando demostrado que el mismo cumple con los parámetros de especificidad, precisión, linealidad y exactitud.

BIBLIOGRAFÍA.

1. Roig, J. T. (1974). Plantas medicinales y venenosas de Cuba. De. Ciencia y Técnica. La Habana. 698-699.
2. Fajardo, D.; Díaz, M.; Galup, O., y Rosado, A. (1988). Algunos aspectos sobre la composición química y posibles aplicaciones del Aloe. Revista CENIC (ciencias químicas). 19 (1-2-3). 97-102.
3. Japan Patent 78.59.019. 27 de mayo de 1978. Appl. 76/132. 215. 2 de noviembre de 1976.
4. Japan Patent 79.119.018. 14 de septiembre de 1979. US Appl. 883.749. 6 de marzo de 1978.
5. Grindley y Reynolds (1986). The Aloe vera phenomenon: A review of the properties and modern use of the leaf parenchyma gel. J. of Ethnopharmacology. 16. 117-151.
6. . . . *(continúa hasta la cita Nº 19)*

15.2. LECHE FLUIDA Y YOGUR NATURAL ENRIQUECIDOS CON HIERRO.

L. Batilde, S. Banguela, Ma. J. De Ortega, R. Torricella y J. Camejo

Instituto de Investigaciones para la Industria Alimentaria (IIIA). Cuba.

Fuente: *Revista Alimentaria No 260. Marzo 1995. Madrid. España.*

RESUMEN

En el presente trabajo se evaluaron dos niveles de adición de hierro para la leche y el yogur natural correspondientes a 7 y 10 ppm de hierro en forma de sal ferrosa de $FeSO_4.7H_2O$, realizándose la comparación con los correspondientes controles sin enriquecer.

Los productos fueron evaluados con catadores adiestrados. Se determinó el contenido de hierro total y ferroso, el grado de oxidación de la grasa y la composición nutricional de ambos alimentos.

Se concluyó que es posible enriquecer la leche hasta 10 ppm y el yogur sólo hasta 7 ppm de hierro sin afectar su calidad sensorial manteniendo los tiempos de garantía establecidos. La ingestión de un litro de estos productos suministra alrededor de 10 mg de hierro, cantidad que cubre más del 70% de las necesidades diarias de este nutriente en los niños y otros grupos poblacionales que los consuman.

INTRODUCCIÓN

La deficiencia de hierro es el trastorno nutricional más frecuente y la causa más común de anemia en América Latina y el Caribe, siendo la ferropénica la más abundante de todas y como malnutrición sigue en orden de importancia la proteico-energética (1, 2).

En Cuba se han realizado diversas encuestas y estudios nutricionales para conocer el estado de nuestra población con relación a la deficiencia de hierro (3, 4, 5, 6, 7) estableciéndose en general, que, fundamentalmente, dentro de los grupos más vulnerables como son los niños entre 6 y 24 meses, embarazadas, madres lactantes y mujeres de edad fértil, existen evidencias suficientes para considerar que hay problemas con la nutrición de este elemento esencial.

El enriquecimiento de los alimentos de amplio consumo con sales de hierro, ha sido desde hace varios años, una medida internacionalmente reconocida para disminuir esta prevalencia de anemia ferropénica, habiéndose empleado para ello: pan, galletas, fórmulas infantiles, leche y otros (1).

En Cuba desde la pasada década se empezaron a enriquecer experimentalmente los purés de frutas y vegetales. Sin embargo, los niveles de hierro que pueden adicionarse en estos productos, no son capaces de cubrir los requerimientos diarios, por lo que se hace necesario enriquecer otros productos como la leche y el yogur que son alimentos de alto valor nutricional, que se distribuyen en grandes cantidades no solo para niños, sino para las embarazadas, adolescentes y otros grupos vulnerables.

Varias son las sales que se emplean para el enriquecimiento de alimentos, siendo el $FeSO_4.7H_2O$ el que goza de un alto índice de absorción y bajo costo, por lo que

se emplea ampliamente en alimentos, en medicamentos, y como sal de referencia en el estudio de absorción de otras formas de hierro. La alta reactividad de esta sal específicamente en procesos de oxidación-reducción ha limitado su uso en alimentos de larga duración o que presenten contenidos de grasas sensibles al enranciamiento siendo, además, recomendable no emplearla en concentraciones superiores a 20 y 30 mg / kg de producto (9).

Esta desventaja no resulta excluyente en el enriquecimiento de la leche y el yogur, ya que ambos son productos perecederos y las cantidades de hierro a adicionar en los mismos son inferiores a las que provocan efectos indeseables. Aunque algunos autores (10, 11) han encontrado en leches enteras alteraciones oxidativas cuando se adicionan más de 10 ppm de hierro.

Tomando en consideración todo lo anterior el objetivo de la presente investigación consistió en definir los niveles de $FeSO_4.7H_2O$ que puedan añadirse a la leche fluida y al yogur natural sin que se afecten sus características sensoriales y su conservación.

MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo se desarrolló en 2 etapas: una de laboratorio, donde se hicieron pruebas de tanteo y, otra posterior, a escala piloto.

Para definir los niveles de hierro a añadir se tomaron en cuenta los requerimientos propuestos por la Junta de Alimentación de la FAO para lactantes, que oscila entre 6 y 15 mg/día y para niños mayores entre 10 y 15 mg/día (12) y los resultados de pruebas preliminares donde se detectó que de utilizar concentraciones de hierro superiores a 11 ppm se producían afectaciones del sabor. Por todo esto, se decidió evaluar la adición de 10 mg de sal ferrosa de $FeSO_4.7H_2O$ por cada litro de leche o yogur.

En dichos estudios no se evaluaron las posibles afectaciones durante el almacenamiento (13), por lo que en el presente trabajo se decidió introducir un nivel más bajo de adición de 7 ppm, semejante al empleado por Gay (14) para el enriquecimiento de leche maternizada logrando buenos resultados.

A escala de laboratorio se realizaron dos producciones independientes de leche y yogur de dos litros cada una, y se chequearon los tiempos de coagulación del yogur para detectar posibles alteraciones de este paso tecnológico.

A las 24 horas de elaborados todos los productos se sometieron al criterio de un panel de cuatro catadores adiestrados, aplicando las instrucciones normalizativas establecidas para evaluar la calidad de la leche y el yogur (15, 16).

En la planta piloto se realizaron 8 producciones tanto de leche como de yogur empleando niveles de 50 litros cada una, cuatro con 7 ppm de hierro y el resto con 10 ppm. Paralelamente se produjeron iguales cantidades de leche y yogur sin enriquecer, las que se tomaron como controles.

La sal ferrosa en las cantidades necesarias para garantizar las referidas adiciones de 7 y 10 ppm respectivamente se adicionaron en el tanque a la leche (previamente disuelta en una porción de leche) clarificada y estandarizada antes del proceso de pasterización.

Las producciones se realizaron siguiendo las instrucciones tecnológicas establecidas en las normas para la leche pasteurizada y yogur natural (15, 12). Los productos terminados fueron almacenados en cámaras refrigeradas a 10°C para su posterior análisis.

De cada réplica de producción se tomaron 4 muestras individuales para determinar el contenido de hierro total y ferroso, incluyendo también los controles. Para determinar el hierro total se aplicó un método de absorción atómica empleando un equipo Pye Unicam SP-2900, según la norma vigente (17). El ferroso se determinó por el método espectrofotométrico con 1 y 10-fenantrolina (18). Todos los análisis se realizaron por duplicado.

Se determinó también el índice del ácido tiobarbitúrico (TBA) para evaluar la oxidación de las grasas en la leche, mediante el método de Krilova y col. (19).

Este índice ha sido estandarizado solamente en leches y cremas, por lo que no se aplicó en el caso del yogur. Los análisis se realizaron diariamente durante 72 horas, que es el tiempo de garantía establecido para este producto según la norma vigente.

Para la caracterización nutricional de los productos, se tomaron 2 muestras de cada producción, evaluándose los contenidos de humedad, proteínas, cenizas, grasa, hidratos de carbono, lactosa y valor energético por los métodos establecidos en las normas vigentes (20, 21, 23). Las concentraciones de Ca, Mg, Na y K se determinaron por absorción atómica y por el método de molibdovanadato las de P (20), realizándose las determinaciones por duplicado.

La evaluación sensorial de los productos se realizó aplicando las mismas instrucciones señaladas en la etapa de laboratorio utilizando un panel de 9 catadores adiestrados.

La leche se evaluó diariamente hasta las 72 horas y el yogur en días alternos a partir de las 24 horas de elaborado, hasta el término de 7 días, que es el tiempo de durabilidad establecido en la norma cubana vigente para este producto (23, 24).

Se determinaron los estadígafros simples a los resultados obtenidos para el contenido de hierro total y ferroso, determinándose los intervalos de confianza para $\alpha = 0.05$.

Los rangos del índice de TBA como expresión del nivel de oxidación se establecieron mediante un método espectrofotométrico descrito por Krilova y col. (19). Los resultados se relacionan con la densidad óptica determinada (DO).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

En las pruebas a nivel de laboratorio no se encontraron defectos de tipo sensorial en las leches para los dos niveles de enriquecimiento evaluados, al igual que en el yogur con 7 ppm de hierro. Sin embargo, en el yogur con 10 ppm uno de los cuatro jueces detectó un ligero sabor astringente en las dos producciones evaluadas, lo que no afectó de forma sensible la puntuación final promedio otorgada al producto, que fue de 17.4, la cual según la escala empleada corresponde a la categoría de <<buena>> (15.4 – 17.4). Tampoco se detectaron cambios en la consistencia del yogur por la adición de la sal ferrosa. Los tiempos de coagulación del yogur enriquecido se mantuvieron inalterables con relación al yogur control, estando entre 2:20 y 2:30 horas.

Valorando estos resultados se mantuvieron las condiciones de trabajo propuestas para las pruebas piloto, sin excluir ninguno de los niveles de adición previamente seleccionados.

De los resultados que aparecen en la tabla 1 se puede apreciar que la leche sin enriquecer presentó 2.9 ± 0.80 ppm de hierro total y las enriquecidas contuvieron prácticamente esta cantidad más la correspondiente al nivel de adición establecido (7 y 10 ppm).

La variabilidad de los resultados para las 4 réplicas fue pequeña, lo que denota buena uniformidad en las muestras evaluadas, así como un buen ajuste del método de análisis.

Tabla 1.

Contenido de hierro total en leche y yogur enriquecidos y sin enriquecer (N=6) [(a)]

Producto	Leche		Yogur	
	Hierro total (ppm)	Hierro ferroso (ppm)	Hierro total (ppm)	Hierro ferroso (ppm)
Control	2.9 ± 0.5	1.4 ± 0.2	2.06 ± 0.3	2.3 ± 0.2
Enriquecido 7 ppm	10.5 ± 0.6	3.4 ± 0.5	9.3 ± 0.7	8.9 ± 0.5
Enriquecido 10 ppm	13.1 ± 0.8	6.6 ± 0.2	12.2 ± 0.5	10.8 ± 0.3

(a) Valores promedios ± desviación estándar

Las leches enriquecidas presentaron contenidos de hierro ferroso inferiores a los añadidos, habiéndose oxidado en el proceso entre el 35% y el 50% del mismo, hecho muy favorecido por el pH casi neutro de la leche (pH = 6.7), que no resulta propicio para mantener el hierro en su forma reducida (8) (tabla 1).

En la leche sin enriquecer el hierro en forma ferrosa fue aproximadamente el 50% del total presente en el producto, por lo que una parte importante de este elemento se encuentra oxidado como Fe^{3+}, el cual resulta también soluble en este medio.

El yogur sin enriquecer presentó valores de hierro total muy parecidos a los de la leche, lo cual se corresponde con lo informado por la literatura (21, 22). Es de destacar que tanto la leche como el yogur sin enriquecer poseen valores de hierro superiores a los informados para otros países, los cuales oscilan entre 1 y 2 ppm.

Las pequeñas variaciones obtenidas en los resultados evidencian que los mismos se encuentran dentro del rango de precisión del método analítico empleado (17, 23).

Con respecto al hierro ferroso puede notarse que en el yogur hay mucha más estabilidad de dichos iones, habiéndose oxidado alrededor de un 12%, lo que está relacionado con la mayor acidez de este producto. Cabe, entonces, pensar que la absorción del nutriente será mejor en el yogur que en la leche enriquecida, ya que el medio ácido es un factor que coadyuva a una mayor utilización del hierro de los alimentos (1, 8). No obstante, debe aclararse convenientemente que no es factible predecir con exactitud la efectividad de ningún alimento enriquecido para incrementar los niveles de hierro en el organismo, sin antes hacer estudios de absorción según los métodos recomendados por la Organización Mundial de la Salud (1), ya que hay múltiples factores que pueden afectar la bioutilización de este nutriente.

Si se analizan los requerimientos de hierro establecidos por la FAO para lactantes y niños (13) puede decirse que con la ingestión diaria de un litro de leche o yogur enriquecido se garantiza cubrir más del 70% de las necesidades de hierro de los mismos.

En la tabla 2 se observa que los rangos de valores del índice de TBA de la leche patrón son más bajos que los de las leches enriquecidas, pero en ninguno de los casos se sobrepasan las cifras entre 0.42 y 0.64, por arriba de los cuales según se informa en la literatura (19) el grado de oxidación puede ocasionar sabores extraños. Los datos obtenidos con la leche patrón fueron semejantes a los encontrados por otros autores en leches cubanas (13), mientras que las de los productos enriquecidos no coincidieron con los informes presentados por Wong y King (11) cuando adicionaron 10 ppm como $FeSO_4..7H_2O$ a leche entera de vaca pasteurizada. Dichos autores detectaron afectaciones de la grasa provocadas por la presencia del ión ferroso, lo que dio lugar a que las cifras del índice del TBA fueran altas.

Los resultados de la evaluación sensorial (tabla 3) evidencian que la leche patrón al igual que la enriquecida obtuvo calificación de excelente a través de todo el período de estudio. En ningún caso los panelistas detectaron sabores ni olores extraños referentes a la adición de hierro, ni tampoco de oxidación de grasa. Con relación al yogur, el que contenía 10 ppm de hierro obtuvo calificación de excelente solamente hasta las 72 horas de producido, ya que en las siguientes evaluaciones algunos jueces detectaron sabor astringente, el que se acentuaba con el paso del tiempo de conservación.

Tabla 2.

Valores de densidad óptica (DO) como expresión del límite de ácido tiobarbitúrico (TBA) en leches control y enriquecidas

	Tiempo de conservación (horas)		
	24	48	72
Control	0.031 – 0.040	0.036 – 0.042	0.038 – 0.045
Enriquecida 7 ppm	0.036 – 0.045	0.037 – 0.040	0.037 – 0.047
Enriquecida 10 ppm	0.037 – 0.047	0.039 – 0.042	0.052 – 0.057

Tabla 3.

Resultados de la evaluación sensorial de la leche y yogur enriquecidos

Muestras	Leche			Yogur			
	Tiempo (horas)			Tiempo (días)			
	24	48	72	1	2	3	4
Control	19.0	19.0	19.4	19.2	18.4	18.6	17.9
Enriquecida 7 ppm	18.4	19.4	19.0	19.0	17.9	18.4	17.7
Enriquecida 10 ppm	18.1	19.0	19.3	19.6	18.1	16.7	16.4

Calificación: Excelente (17.5 – 20.0), Buena (15.4 – 17.4)

Analizando estos resultados se decidió evaluar las dos últimas producciones de yogur enriquecidos por un grupo de catadores adiestrados en la cata de yogur y en la detección de sabor metálico, respectivamente (6 jueces) utilizando el método de evaluación de yogur del Centro Tecnológico de la Leche para Chile y América Latina de la FAO (25).

Los resultados obtenidos por este método de evaluación (tabla 4) arrojaron que el yogur con adición de 7 ppm de hierro fue calificado como bueno obteniendo una puntuación relativamente alta, aún a la semana de producido. El yogur con 10 ppm fue considerado no aceptable en todas las evaluaciones y se le situaron como principales defectos, sabor astringente, así como olor ligeramente defectuoso. Se señaló por algunos jueces que el coágulo era muy fino lo que modificaba también la consistencia. Con estos datos se definió que la dosificación de 7 ppm de hierro no produce alteraciones indeseables en el yogur.

Tabla 4.

Puntuación obtenida para el yogur enriquecido evaluado por el método del Centro Tecnológico de leche de Chile y América Latina (FAO)

Producto	Tiempo de conservación (días)			
	1	3	5	7
Enriquecido 7 ppm	23.5	23.0	23.0	22.0
Enriquecido 10 ppm	19.0	17.0	14.5	-

De la composición nutricional promedio que aparece en la tabla 5 se puede apreciar que estos productos se corresponden con leche y yogur parcialmente descremados que se producen en otros países (21).

Tabla 5.

Composición nutricional y algunos índices físico químicos de calidad de la leche y el yogur enriquecido con 7 ppm de hierro, comparados con productos semejantes (expresado en 100 g de alimento)

Composición	Leche enriquecida	Leche pasteurizada italiana	Yogur enriquecido	Yogur inglés	Yogur holandés
Valor energético (Kcal)	51	49	51	55	58
Humedad (g)	89.54	88.50	89.86	89.00	88.00
Sólidos totales (g)	10.46	11.50	10.14	11.00	12.00
Proteínas (g)	2.74	3.50	2.75	3.2	3.3
Grasa (g)	2.40	1.80	2.50	2.50	3.20
Hidratos de carbono no totales (g)	4.69	5.00	4.34	4.60	4.00
Lactosa (g)	4.69	-	2.88	-	-
Monosacáridos (g)	-	-	1.46	-	-
Cenizas (g)	0.63	-	0.55	0.70	-
Fe (mg)	1.05	0.10	0.93	0.10	-
Ca (mg)	164.00	120.00	125.00	120.00	120.00
P (mg)	73.00	94.00	68.00	93.00	90.00
Mg (mg)	18.00	-	16.00-	-	-
Na (mg)	100.00	-	75.00	-	50.00
K (mg)	150.00	-	120.00	-	150.00
Acidez (% ácido láctico)	0.13	-	0.84	-	-
pH	6.70	-	4.20	-	-

Las diferencias encontradas pudieran deberse a la influencia que ejercen la dieta animal, la raza, el clima y otros factores en el contenido de los macro y micro elementos presentes en la leche (21, 22).

CONCLUSIONES

Es posible enriquecer la leche fluida con 7 y 10 ppm de hierro y el yogur natural con 7 ppm en forma de sal ferrosa de $FeSO_4..7H_2O$ sin afectar su calidad durante los tiempos de garantía establecidos en las normas cubanas vigentes. La adición de esta sal no produjo afectaciones de tipo oxidativo en la grasa de la leche ni siquiera después de 7 días de almacenamiento a 10°C.

La ingestión de un litro de leche o yogur enriquecidos con la sal ferrosa de $FeSO_4.7H_2O$ suministra alrededor de 10 mg de hierro, cantidad que cubre en

gran medida al requerimiento diario de este nutriente en los niños y otras poblaciones que los consumen.

BIBLIOGRAFÍA.

1. OMS (1975): Lucha contra la anemia nutricional, especialmente contra la carencia de hierro. Informe de la reunión mixta ADI/OIEA/OMS. Serie de informes técnicos. Núm. 580. Ginebra.
2. Chandra. Y. R. (1970): La anemia ferropénica en la población de América Latina y el Caribe. Boletín O.S.P. vol LXII. Núm.5.
3. Cabrera.A: Chí. N.Díaz.Y. y Gay.J. (1969): Encuesta nutricional de San Andrés de Caiguanabo. Bol. Hig. Epid.8:3.Cuba.
4. Cabrera.A: Chí. N.Díaz.Y. y Gay.J. y Mateo de Acosta.G. (1970): Encuesta nutricional de Alquizar.Bol.Hig.Epid.8:3.Cuba.
5. Torre de la E.E. y Artigas.E. (1973): Valores de la hemoglobina en niños entre 6 y 12 meses de edad.Rev.Cub.Ped. 45:69,l,Cuba.
6. . . . *(continúa hasta la referencia Nº 25)*

15.3. DESINFESTACIÓN DEL FRIJOL DE SOJA POR IRRADIACIÓN

M. Alvarez, E.Prieto, J.Mesa, R. Fraga y V. Fung

Instituto de Farmacia y Alimentos. Universidad de La Habana. Cuba.

Fuente: *Revista Alimentaria No 276. Octubre 1996. Madrid. España.*

RESUMEN

En el trabajo se estudió el efecto de la irradiación con dosis de 0.5 y 1.0 kGy en la desinfestación del frijol de soja y en diferentes componentes químicos de importancia en este producto. Los resultados mostraron la efectividad de las dosis aplicadas en el control del plagamiento por insectos de la soja durante su almacenamiento. Los contenidos de proteínas totales, grasa y humedad, así como las características de identidad y de calidad de la grasa extraída al producto irradiado, no se alteraron por la irradiación.

INTRODUCCIÓN

El frijol de soja es un producto fácilmente plagado por insectos, lo que ocasiona alteraciones y pérdidas del mismo durante su almacenamiento, en Cuba las especies *Tenebroides mauritanicos* (L), *Tribolium castaneum* Herbst, *Rhizopertha dominica* (F), *Sitophilus oryzae* (L) y *Corcyra cephalonica* (Staint) han sido detectadas en este producto en diferentes ocasiones (1,2).

El método tradicionalmente utilizado para el control de insectos en granos y cereales es la fumigación, pero por los inconvenientes que presenta, fundamentalmente los relacionados con la salud de los consumidores y del personal involucrado en la actividad, las autoridades sanitarias de diferentes países han establecido numerosas restricciones para su aplicación y en algunos casos se ha prohibido totalmente (3,4).

La tecnología de irradiación ha sido demostrada como un método eficaz en la desinfestación de estos productos (3-11) y supera además las limitaciones de la fumigación (3,5). Específicamente en Cuba se han obtenido resultados satisfactorios en harinas de trigo y de maíz, arroz, frijoles y cacao plagados con las especies de insectos de mayor importancia económica para estos productos (7-11).,

Dosis de radiaciones ionizantes de hasta 1kGy son capaces de controlar los insectos que plagan los alimentos (3-11) y ya desde 1980 se concluyó la inocuidad de los productos alimenticios irradiados con dosis de hasta 10 kGy (12), valor 10 veces mayor que el máximo establecido por el Codex Alimentario en su norma sobre alimentos irradiados (13) para la aplicación de esta tecnología con objetivos desinfestantes.

Atendiendo a todo lo anteriormente planteado y a la gran importancia de la soja en la dieta consumida en la actualidad, el presente trabajo tuvo como objetivos lograr la desinfestación del frijol de soja mediante el procesamiento con

radiaciones ionizantes y conocer su efecto en algunos componentes químicos de importancia en este alimento.

MATERIALES Y MÉTODOS

El frijol de soja (*Glicine max*) utilizado tuvo un plagamiento medio (7 insectos por kg de producto) según los criterios de evaluación de la infestación en granos almacenados (1,14), la especie presente fue *Tribolium castaneum* Herbst, lo que se conoció después de incubar muestras del producto en cajas entomológicas durante 45 días a 30 ± 1ºC de temperatura y 73% de humedad relativa (1), debido a la existencia de estadíos microscópicos al comenzar la investigación. La especie encontrada se identificó por comparación con material existente en el Instituto de Investigaciones para la Industria Alimentaria (IIIA).

El producto envasado en bolsas de polietileno (400 g por bolsa) se procesó con radiaciones ionizantes en condiciones ambientales en la planta de irradiaciones del IIIA, la que posee un irradiador de cobalto-60. El total de bolsas se dividió en 3 grupos, irradiándose uno con una dosis media mínima de 0,5 kGy, según lo expresado en la literatura sobre la suficiente efectividad de esta dosis para el control de la infestación en granos, cereales, etc. (5,6), otro grupo se irradió con una dosis media global de 1,0 kGy, que es el mayor valor de dosis admitido internacionalmente para este objetivo (12,13), el grupo restante, control, se mantuvo sin irradiar. El control dosimétrico del proceso se realizó mediante el empleo de los dosimétricos Fricke y cérico-ceroso.

Los 3 grupos de productos fueron almacenados durante 60 días en condiciones controladas, iguales a las fijadas para conocer el grado de plagamiento del frijol de soja al comienzo de la experiencia.

Con posterioridad a la irradiación del producto y periódicamente durante su almacenamiento (15, 30 y 60 días) se hicieron los conteos de los estadíos macroscópicos de insectos por tamizado y examen visual (15) a muestras de 1 kg de cada uno de los grupos, tomadas siguiendo un diagrama Z (16). Estas muestras después de evaluadas se colocaron en cajas entomológicas durante 45 días en las condiciones de temperatura y humedad relativa antes citadas para cuantificar también los estadíos imposibles de detectar visualmente en el momento del análisis. La efectividad del tratamiento se determinó mediante la aplicación del método de Abbott (17).

Inmediatamente después de irradiada la soja, se determinaron los contenidos de proteínas totales (18), grasa (19) y humedad (18). Además, durante los dos meses de almacenamiento se le determinó a la grasa del producto, extraída en frío (20), los índices de yodo, refracción, acidez y peróxido (20).

Para el análisis estadístico de los resultados se aplicó la prueba de t de student ($p \leq 0,05$), para determinar si existían o no diferencias significativas entre las muestras irradiadas con las diferentes dosis y el control.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados de los análisis entomológicos mostraron que en el frijol de soja no irradiado existió un incremento de la infestación a partir de 7 insectos x kg^{-1}, llegando a tener 32 insectos x kg^{-1}, siempre de la especie *Tribolium castaneum* Herbst, a los 60 días de almacenamiento en las condiciones controladas (tabla 1).

Tabla 1.

Efecto de la irradiación en la infestación existente en el frijol de soja y su comportamiento durante el almacenamiento postratamiento del producto.

Dosis (kGy)	Cantidad de insectos por kg de producto*			
	Tiempo de almacenamiento (días)			
	0	15	30	60
0	7	16	20	32
0,5	0	0	0	0
1,0	0	0	0	0

**insecto presente: Tribolium castaneum Herbst.*

Sobre la efectividad de la irradiación en el plagamiento existente en el producto se obtuvo que las dosis aplicadas 0,5 y 1,0 kGy no permitieron el desarrollo de los estadíos biológicos, huevos y larvas pequeñas, que estaban presentes en la soja en el momento de aplicarse el tratamiento, es decir, hubo una incapacidad de desarrollo de los estadíos biológicos, huevos y larvas pequeñas, que estaban presentes en la soja en el momento de aplicarse el tratamiento, es decir, hubo una incapacidad de desarrollo de los mismos como consecuencia de la irradiación, lográndose un 100% de mortalidad, que se constató al no detectarse estadíos microscópicos, ni vivos ni muertos, después de incubadas las muestras en las cajas entomológicas en las condiciones establecidas. Durante los 60 días de almacenamiento del producto postirradiación, las muestras permanecieron totalmente desinfestadas (tabla 1). Estos resultados corroboraron lo planteado tanto en la literatura internacional (3-6) como en las investigaciones realizadas en Cuba (7-11) sobre la factibilidad de las dosis estudiadas, en la desinfestación de cereales y granos.

Sobre el efecto del procesamiento con radiaciones ionizantes en los contenidos de proteínas totales, grasa y humedad del frijol de soja, el análisis estadístico de los resultados arrojó que no hubo diferencias significativas ($p \leq 0,05$) en los productos irradiados con respecto al control (tabla 2), lo que está en concordancia con lo encontrado en un trabajo realizado en Pakistán (21), en el cual se aplicaron dosis de hasta 5 kGy y tampoco hubo afectación en los mismos. Estos resultados también coinciden con los obtenidos cuando se aplicaron las dosis adecuadas a otros granos y cereales para controlar su plagamiento por insectos (7, 9-11).

Tabla 2.
Efecto de la irradiación del frijol de soja en el contenido de diferentes componentes químicos de importancia para el producto.

Dosis (kGy)	Componente químico (%)		
	Proteínas totales*	Grasa*	Humedad*
0	36,4	20,6	10,4
0,5	36,5	20,4	10,3
1,0	36,1	20,5	10,1

** No diferencia significativa ($p \leq 0,05$) entre 0 kGy y cada dosis de irradiación.*

En la determinación de las características de identidad, índice de yodo y de refracción, de la grasa extraída a la muestra control y las irradiadas no se encontraron variaciones significativas ($p \leq 0,05$) debido al tratamiento aplicado (tabla 3). Tampoco se presentaron diferencias para igual nivel de significación en las características de calidad de la grasa evaluada, es decir en el índice de acidez y de peróxido, durante el almacenamiento de las muestras en las condiciones controladas (tabla 4). Aunque la aplicación de la tecnología con dosis desinfestadas no dio lugar a la aceleración de un proceso lipolítico, ni tampoco oxidativo de los lípidos del frijol de soja, ambos índices se incrementan con el tiempo de almacenamiento, como era esperado.

Los lípidos se encuentran entre los compuestos químicos más radiosensibles, sin embargo, al aplicar las dosis que aseguran el control de insectos en productos alimenticios, no se encontró variación en el índice de acidez de la grasa presente en el cacao y el trigo (11,22), lo que coincide con los resultados de este trabajo con el frijol de soja. Sobre el índice de peróxido, tampoco se encontraron planteamientos específicos para la soja, pero este presentó un comportamiento similar, inmediatamente postirradiación, al encontrado en la grasa de cacao irradiado con 0,5 kGy (11).

Tabla 3.
Efecto de la irradiación del frijol de soja en las características de identidad de la grasa extraída al mismo postratamiento.

Dosis (kGy)	Características de identidad	
	Indice de iodo* (g I_2 x g grasa^{-1})	Indice de refracción* (η 40ºC)
0	119,10	1,469
0,5	119,93	1,469
1,0	120,44	1,469

** No diferencia significativa*

Tabla 4.
Efecto de la irradiación del frijol de soja en los índices de calidad de la grasa extraída al mismo durante el almacenamiento postratamiento del producto.

Dosis (kGy)	Indice de calidad			
	Indice de acidez* (mg KOH x g grasa^{-1})		Indice de peróxido* (meq O_2 x kg grasa^{-1})	
	t=0	t=60	t=0	t=60
0	4,00	4,94	6,5	12,0
0,5	4,20	5,02	6,3	10,9
1,0	4,22	4,90	6,5	13,3

** No diferencia significativa ($p \leq 0,05$) entre 0 kGy y cada dosis de irradiación.*

CONCLUSIONES

La aplicación de la tecnología de irradiación con dosis de 0,5 y 1,0 kGy logró mantener el frijol de soja totalmente desinfestado durante su almacenamiento en condiciones que precisamente favorecen el desarrollo del plagamiento.

Las dosis aplicadas no afectaron los contenidos de proteínas totales, grasa y humedad de la soja y tampoco alteraron las características de identidad de la grasa extraída al producto, ni aceleraron los procesos lipolítico y oxidativo para la higienización de los granos y cereales.

BIBLIOGRAFÍA.

1. Hall, D.(1980): Handling and storage of grains in tropical and subtropical areas, 3. ed., Roma, FAO.
2. La Rosa, J., y Vázquez, L. (1987): "Distribución, daños y lucha contra los principales insectos de los productos con vegetales almacenados", Memorias I Seminario Científico Internacional de Sanidad Vegetal, Ciudad de La Habana.
3. Ahmed, M. (1988): Desinfectación de granos y almacenamiento de papas después de la irradiación. Primer Taller sobre Irradiación de Alimentos, IIIA, Ciudad de La Habana, I.
4. OIEA (1984): Tratamiento de Alimentos por Irradiación, Viena, OIEA.
5. IAEA (1982): Training manual on food irradiation technology and techniques, technical report series No. 1114, 2. ed., IAEA, Viena.
6. ….. *(continúa hasta la Nº 22)*

15.4. CARACTERIZACIÓN ANALÍTICA DE ALGINATO DE SODIO

H. Zumbado[(1)], D. Fajardo[(1)], J. Díaz[(2)]

(1) Instituto de Farmacia y Alimentos. Universidad de La Habana. Cuba
(2) Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología. Cuba

Fuente: *Revista Alimentaria No 329. Enero-Febrero 2002. Madrid. España*

RESUMEN

Se realizó una caracterización estructural y físico química a dos muestras de alginato de sodio de diferente procedencia. Se determinaron sus características espectrales en la región del IR, el peso molecular y la relación entre sus ácidos urónicos (relación M/G), así como también se realizó una evaluación de ambos productos atendiendo a las especificaciones establecidas por los organismos internacionales para su empleo como aditivo alimentario.

Se concluyó que el alginato de sodio de procedencia nacional posee un peso molecular de 426 579 g/mol y es rico en ácido gulurónico (relación M/G = 0.56) mientras que el polímetro de procedencia mexicana resultó ser una mezcla constituida por tres tipos de alginatos de diferente peso molecular: 1 584 893, 794 328 y 501 187g/mol y posee mayor contenido en ácido manurónico (relación M/G = 6). Así mismo, ambos productos cumplen con las especificaciones físico químicas establecidas por los organismos internacionales para su empleo como aditivo alimentario, aunque el alginato cubano posee un mayor contenido de calcio.

INTRODUCCIÓN

Los alginatos son polisacáridos coloidales hidrófilos que se obtienen de las algas marinas de la clase *Phaeophyceae,* conocidas comúnmente como algas pardas. Estos productos son ampliamente utilizados a nivel mundial en la industria de los alimentos debido a sus propiedades como agentes espesantes y gelificantes, así como también por su capacidad de actuar como suspensores y estabilizantes (Gordon, 1990; Indergaard, 1991).

La obtención de alginato de sodio de producción nacional es un objetivo en torno al cual diferentes instituciones científicas han desarrollado tareas investigativas desde la década del 80. Este interés se sustenta en la gran riqueza marina explotable que posee Cuba y en los beneficios que a largo plazo puede reportarle a la economía del país.

A partir de 1994, el Departamento de Química Básica del Instituto de Farmacia y Alimentos de la Universidad de La Habana, ha realizado diferentes estudios dirigidos a la obtención y caracterización físico química y reológica de alginato de sodio procedente de *Sargassum sp* (Lewis y col., 1995; Zumbado y col., 1999a; Zumbado y col., 1999b) y a su empleo como aditivo en diferentes sistemas alimentarios (Zumbado, 1999; Zumbado y col., 2000); sin embargo, la introducción de este polímero exige también investigaciones dirigidas a su caracterización estructural.

Está bien establecido que los alginatos son copolímeros lineales constituidos por unidades de ácido β-D-manurónico y α-L-gulurónico, los cuales se encuentran

unidos a través de enlaces glicosídicos y están a su vez distribuidos en tres bloques diferentes (Smidrod, 1974) (figura 1). Sin embargo, tanto la proporción entre los monómeros como su ordenamiento dentro de las cadenas, depende de la especie de alga de la cual proceda el alginato y de otros muchos factores ecológicos. Se ha demostrado además que la relación en que se encuentran los ácidos urónicos influye directamente en las propiedades reológicas de este polímero. Así mismo, el peso molecular es otro importante parámetro analítico que influye directamente en estas propiedades y que depende no solo de la especie de alga sino también del método de obtención utilizado.

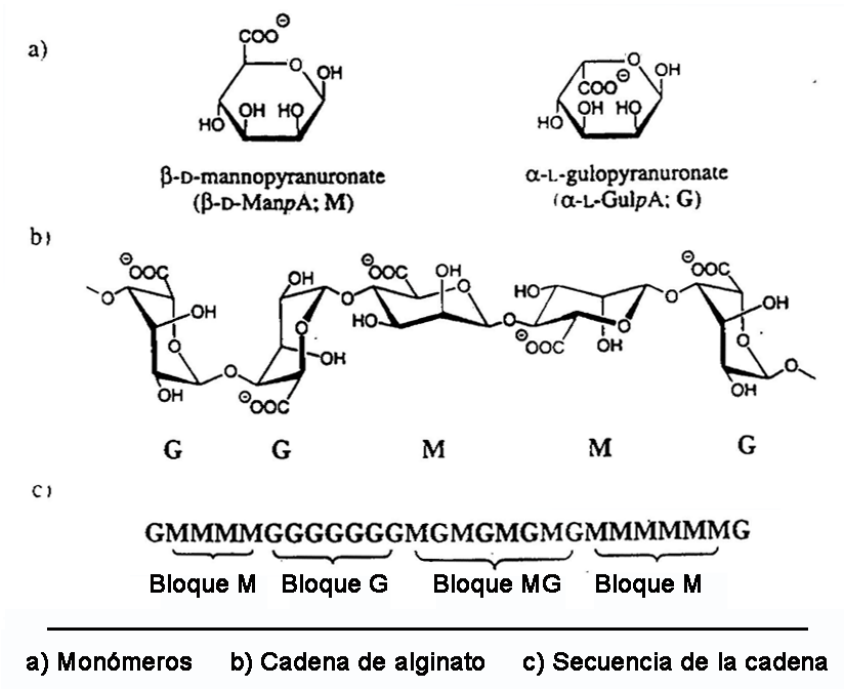


Figura 1. Estructura del ácido algínico

Teniendo en cuenta los elementos anteriormente expuestos se plantea el presente trabajo con los siguientes objetivos:

1. Realizar la caracterización estructural de una muestra de alginato de sodio de procedencia nacional y de un producto mexicano, atendiendo a tres parámetros fundamentales: las características espectrales en la región del IR, el peso molecular y la relación entre sus ácidos urónicos (relación M/G).
2. Evaluar ambos productos atendiendo a las especificaciones establecidas por los organismos internacionales para su empleo como aditivo alimentario.

MATERIALES Y MÉTODOS

Características de las muestras empleadas

Se emplearon muestras de alginato de sodio de producción nacional obtenidas a partir de *Sargassum sp*, en el Instituto de Farmacia y Alimentos de la Universidad de La Habana y alginato de sodio mexicano ALGIMAR F (105 cps) obtenida a partir de *Macrocystis pyrisfera*, en el Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas del Instituto Politécnico Nacional de México. Ambas muestras fueron almacenadas en recipientes de plástico herméticamente cerrados a temperatura ambiente.

Espectro IR

Los espectros IR del alginato cubano y del alginato de referencia se registraron en un espectrofotómetro Spekol IR-75, siguiendo el procedimiento de las pastillas de KBr y barriendo un rango de número de ondas $(\bar{\upsilon})$ entre 4000 y 200 cm^{-1}.

Determinación del peso molecular

La determinación del peso molecular se realizó con una columna de filtración sobre gel TSK G4000SW (300 x 8 mm) TOYO SODA Co, empleando como fase móvil Agua, NaN_3 0.05%, NaCl 0.25M; a una velocidad de flujo de 0.8 mL/min y presión de 12 atm a temperatura ambiente (25°C).

Para la calibración de la columna se utilizaron como patrones polímeros de dextrana (Pharmacia) T500k, T110k, T70k, T40k, T20k, T10k y polietilenglicol PEG 6000 y PEG 1000; inyectando 20 μL de cada patrón a una concentración de 50 mg/mL. El volumen de exclusión y el volumen total fueron calculados a partir de los volúmenes de elución de la dextrana T2000k y la glucosa respectivamente, preparadas ambas a igual concentración (50 mg/mL).

Las soluciones de alginato (cubano y mexicano) se prepararon a una concentración de 20 mg/mL y se calentaron a 100°C durante 5 minutos. Posteriormente se centrifugó a 1000 rpm y del sobrenadante se inyectaron 20 μL de cada solución.

Se empleó un detector de índice de refracción acoplado al sistema y se registraron los cromatogramas en un sistema computarizado (BIOCRHOM 2.1) con el cual se procesaron los datos obtenidos. La determinación de los pesos moleculares se realizó a partir del coeficiente de partición (K_{av}) el cual fue calculado según:

$$K_{av} = \frac{Ve - Vo}{Vt - Vo}$$

donde: *Kav: Coeficiente de partición*
Ve= Volumen de elución del componente (mL)
Vt = Volumen total (mL)
Vo= Volumen muerto o de exclusión (mL)

Determinación de la relación ácido manurónico / ácido gulurónico (Relación M/G)

Hidrólisis

La hidrólisis del polisacárido se realizó según el método descrito por Haug y Larsen (1962). Se tomaron 50 mg de muestra y se hicieron reaccionar con 0.5 mL de H_2SO_4 al 80% durante 18 horas para posteriormente se añadir 6 mL de agua destilada y lograr una solución ácida 2 N; la hidrólisis se continuó a 100°C durante 5 horas y se neutralizó añadiendo un ligero exceso de $CaCO_3$ hasta que no se observó desprendimiento de gas. Finalmente el precipitado se filtró y lavó 2 veces con agua destilada resultando un volumen total de 12 mL.

Cromatografía de intercambio iónico

Para la determinación de la relación M/G se utilizó una columna convencional (200 x 20 mm) con una resina de intercambio aniónico AG 1-8X, 200-400 mesh en forma AcO^- (Haug y Larsen, 1962). Los 12 mL resultantes de la hidrólisis se mantuvieron en reposo durante 30 minutos a pH=8 antes de ser aplicados a la columna, con el objetivo de convertir las lactonas en ácidos.

La separación se realizó empleando un gradiente lineal de 1 mL/min en un rango de concentraciones desde 0.5 hasta 2M de ácido acético con un volumen total de 300 mL. Se recogieron fracciones de 3 mL en un colector Pharmacia LKB y la detección se realizó por la técnica colorimétrica del Orcinol (Haug y Larsen, 1962). Las fracciones positivas frente al orcinol correspondientes a cada uno de los ácidos urónicos se mezclaron y se cuantificaron con ayuda de una curva de calibración empleando un patrón de ácido glucurónico. Los resultados obtenidos para la fracción correspondiente al ácido gulurónico se multiplicaron por un factor de conversión igual a 0.66 teniendo en cuenta la destrucción preferencial del ácido manurónico durante la hidrólisis (Haug y Larsen, 1962).

Análisis físico químico

La pureza de los productos en estudio se evaluó a través de los métodos de ensayo descritos en FAO. FOOD AND NUTRITION PAPER, 1992. Los análisis realizados fueron los siguientes:

- Ensayo de pureza
- Determinación de las pérdidas en el secado
- Determinación de la presencia de fosfatos
- Determinación de impurezas insolubles
- Determinación del índice de pH
- Determinación de cenizas totales
- Prueba límite de arsénico
- Prueba límite de plomo
- Determinación de metales pesados (expresados como plomo)

Determinación de calcio

Para la determinación de calcio se empleó una técnica de espectroscopia de absorción atómica utilizando un equipo SP-9 Pye Unicam de la firma Philips, con el empleo de una llama aire/C_2H_2. La cuantificación se realizó a través de una curva de calibración empleando una sal certificada de $CaCO_3$ en un rango de concentraciones entre 10 y 100 μg/mL.

Todos los análisis se realizaron por duplicado, calculándose la desviación estándar en los casos que así lo permitieran.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Espectro IR

En la figura 2 se reportan los espectros IR correspondientes al alginato cubano y al alginato mexicano, observándose similares bandas de absorción para ambas muestras. En este sentido, se destacan 3 señales fundamentales: una banda correspondiente a la vibración de valencia del grupo hidroxilo (υ_{OH}) alrededor de los 3500 cm^{-1}, la vibración del grupo carbonilo del carboxilato ($\upsilon_{C=O}$) en las proximidades de los 1680 cm^{-1} y la vibración de valencia carbono-oxígeno (υ_{C-O}) cercano a los 1050 cm^{-1}.

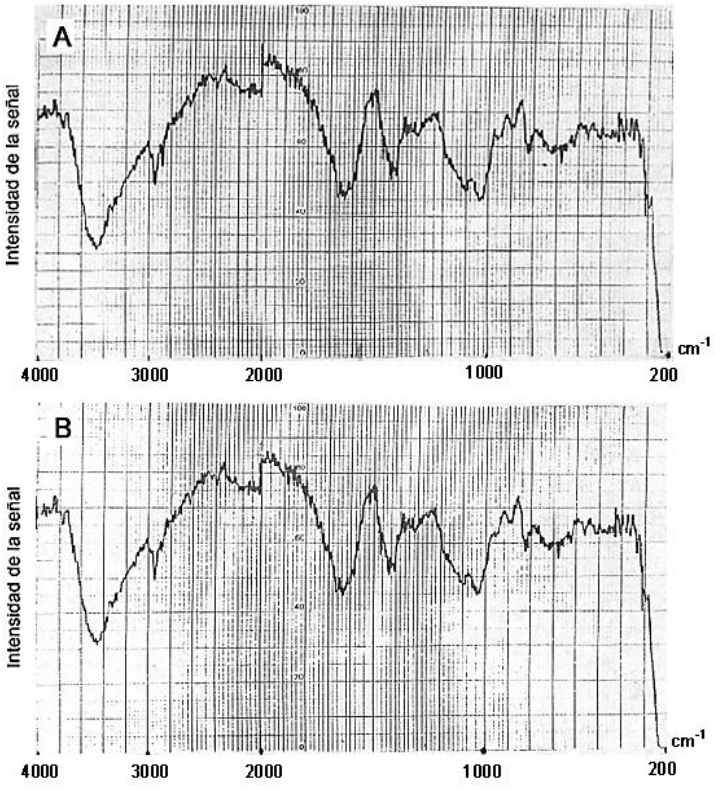


Figura 2. Espectros IR del alginato cubano (A) y del alginato mexicano (B).

Obviamente el espectro IR para este tipo de compuesto está dominado por las señales correspondientes a los grupos hidroxilos y se caracteriza por presentar bandas anchas, lo cual es atribuible al elevado peso molecular de estos polisacáridos. Nishide y col en 1984 reportaron espectros similares en un estudio comparativo de muestras de alginato de sodio procedentes *Kjellmaniella crassifolia*.

Determinación del peso molecular

En la tabla 1 (figura 3) se reportan los resultados obtenidos para la calibración de la columna bajo las condiciones cromatográficas empleadas, evidenciándose una buena linealidad avalada por el valor obtenido de R^2= 0.9707, el cual indica que la regresión explicó el 97% del error total.

Tabla 1

Calibración de columna en la determinación del peso molecular por cromatografía de filtración sobre gel.

PM	Tr	Ve	Kav	log PM
2 000 000	6.93	5.54	0.00	6.30
500 000	9.35	7.48	0.23	5.70
110 000	11.10	8.88	0.39	5.04
70 000	13.04	10.43	0.57	4.85
40 000	13.56	10.85	0.62	4.60
20 000	14.81	11.85	0.74	4.30
10 000	15.67	12.54	0.82	4.00
6 000	16.81	13.45	0.93	3.78
1 000	17.83	14.2	1.02	3.00

Tr: Tiempo de retención (minutos), **Ve:** Volumen de elución (mL),
Kav: Coeficiente de partición, **PM:** Peso Molecular (g/mol)

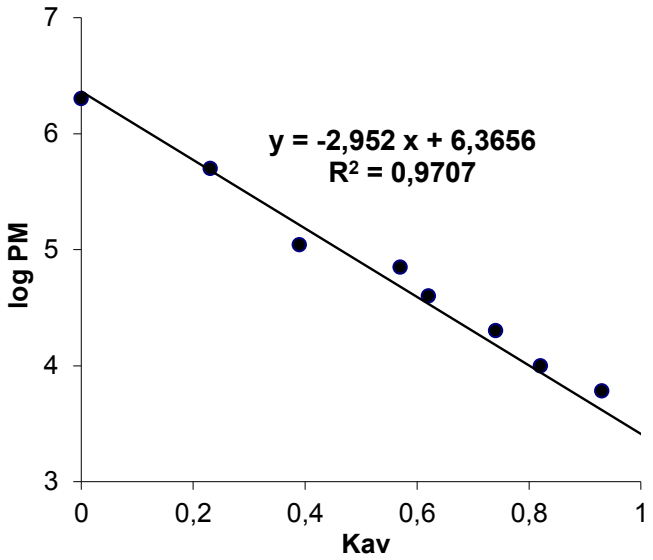


Figura 3. Calibración de columna en la determinación del peso molecular

Los cromatogramas obtenidos y valores de peso molecular resultantes para ambos productos aparecen en la figura 4 y en la tabla 2, respectivamente.

En el caso del alginato cubano, la muestra está constituida por un polímero homogéneo de peso molecular del orden de 10^5 g/mol, resultando coincidente con los reportados por Fujihara y col (1989) en muestras de alginato de sodio obtenidas de *Sargassum fullvellum*.

En relación con los resultados obtenidos para el alginato mexicano resulta interesante comentar que el mismo resultó estar formado por tres fracciones de polímeros de diferente peso molecular lo cual nos lleva a inferir que este producto está constituido por una mezcla de tres tipos de alginatos, obtenidos en diferentes procesos de extracción. Se conoce que esta metodología es

usualmente empleada por firmas productoras mexicanas con el objetivo de lograr un producto final de viscosidad deseada (Ferrer, 1995).

Por otra parte, las diferencias encontradas entre los pesos moleculares del alginato cubano y las fracciones del producto de referencia pueden ser atribuidas a diferencias en la fuente de extracción y en los métodos de obtención empleados.

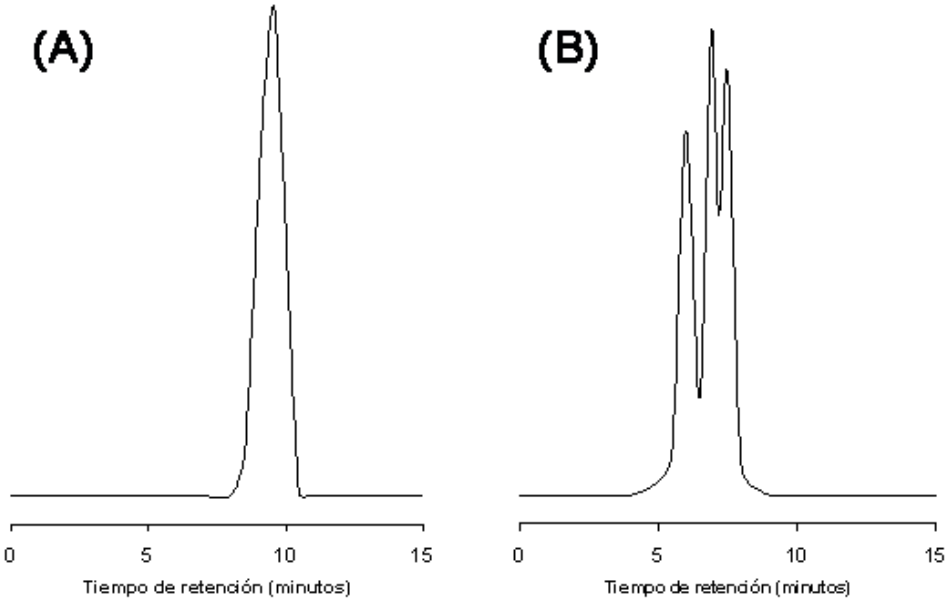


Figura 4. Cromatogramas obtenidos en la determinación del peso molecular para el alginato cubano (A) y el alginato mexicano (B).

TABLA 2

Pesos moleculares obtenidos para las muestras de alginato evaluadas

Parámetros	Alginato cubano	Alginato mexicano		
		Fracción 1	Fracción 2	Fracción3
Tr	9.56	7.60	8.60	9.35
Ve	7.65	6.00	6.90	7.48
Kav	0.25	0.10	0.20	0.23
log PM	5.63	6.20	5.90	5.70
PM	426 579	1 584 893	794 328	501 187

Tr: Tiempo de retención (minutos), **Ve:** Volumen de elución (mL)

Kav: Coeficiente de partición, **PM:** Peso Molecular (g/mol)

Determinación de la relación M/G

La relación M/G encontrada para ambas muestras, empleando la cromatografía de intercambio iónico, se muestra en la tabla 3.

TABLA 3

Relación ácido manurónico / ácido gulurónico (M/G) obtenida para los alginatos evaluados.

PRODUCTO	FRACCIONES				Relación M/G
	Ácido manurónico		Ácido gulurónico		
	Absorbancia	Concentración (mg/mL)	Absorbancia	Concentración (mg/mL)	
Alginato cubano	0.211	0.046	0.569	0.124	0.56
Alginato mexicano	0.511	0.127	0.157	0.032	6

Los resultados obtenidos para el caso del alginato de producción nacional están en concordancia con reportes de la literatura, donde se plantea que de forma general, la relación M/G es menor que la unidad para muestras de alginato provenientes de Sargassum. Nishide y col (1984) estudiaron alginatos obtenidos de siete especies de Sargassum encontrando relaciones M/G entre 0.39 y 0.65. Así mismo, Mizuno y col (1982) reportan valores de 0.34 a 0.56 para muestras de alginato extraídos de cinco especies de *Sargassum*.

La relación M/G encontrada en el alginato mexicano de referencia es marcadamente superior a la unidad (6), lo que puede deberse a que las fuentes de obtención son diferentes. Se conoce que las algas de la especie *Macrocystis pyrisfera*, abundantes en el litoral mexicano y fuente de obtención de este alginato, brindan polímeros de relación M/G $>$ 1, (Ferrer, 1995). Otras especies, como por ejemplo *Kjellmaniella crassifolia*, son contentivas de alginatos altamente ricos en ácido manurónico y cuya relación M/G puede alcanzar valores de hasta 13, (Nishide y col., 1984).

Análisis físico químico de los productos evaluados.

Los resultados de la caracterización físico-química realizada a las 2 muestras de alginato de sodio estudiadas, aparecen en la tabla 4, en la cual puede observarse que los productos evaluados cumplen con todos los parámetros especificados por los organismos internacionales para su empleo como aditivo alimentario, lo que garantiza la pureza y calidad de estos hidrocoloides.

TABLA 4

Análisis físico químico de los productos evaluados.

PARAMETROS	Alginato de Sodio Cubano	Alginato de Sodio Mexicano	Especificación (FAO, 1992)
Ensayo de pureza (%)	95.62 ± 1.85	100.14 ± 2.11	90.8 – 106
Pérdidas en el secado (%)	10.19 ± 0.043	13.63 ± 0.081	15 (máx.)
Cenizas totales (%)	22.69 ± 0.61	22.02 ± 0.63	18 – 27
Sólidos insolubles (%)	0.095 ± 0.003	0.061 ± 0.001	1 (max.)
Fosfatos	No detectado	No detectado	No detectable
Índice de pH	7.5	7.1	6 – 8

PARAMETROS	Alginato de Sodio Cubano	Alginato de Sodio Mexicano	Especificación (FAO, 1992)
Metales pesados (expresados como Pb) (ppm)	Pasa la prueba	Pasa la prueba	40 (máx.)
Plomo (ppm)	Pasa la prueba	Pasa la prueba	10 (máx.)
Arsénico (ppm)	Pasa la prueba	Pasa la prueba	3 (máx.)
Calcio (mg/ 100 g)	546.9 ± 10.21	155.6 ± 3.84	–

Referente al contenido de calcio se observan niveles 3.5 veces superiores en el alginato cubano en comparación con el producto mexicano tomado como referencia. Estas diferencias pudieran ser atribuidas a diferencias en los procesos empleados para la obtención de estos productos. En el caso del alginato de procedencia nacional, la precipitación se realizó con adición de $CaCl_2$ para obtener alginato de calcio, el cual fue transformado, primero a ácido algínico empleando HCl y posteriormente a alginato de sodio por adición de Na_2CO_3. Por su parte el alginato mexicano de referencia pudo haber sido tratado directamente con HCl y posterior adición ce Na_2CO_3 o bien haber sido obtenido por el mismo proceso descrito para el alginato cubano pero con una etapa de descalcificación más eficiente.

Así mismo las diferencias entre las especies de algas empleadas como fuente de obtención (*Macrocystis pyrisfera* para el alginato mexicano y *Sargassum sp* para el producto nacional) son un elemento a considerar a la hora de explicar estos resultados.

El hecho de que el alginato cubano posea un mayor contenido de calcio, unido al elevado peso molecular de este polímero y a la relación M/G encontrada y discutida con anterioridad, apunta a inferir una elevada viscosidad de sus soluciones y una alta capacidad para la formación de gel. No obstante, esta hipótesis debe ser comprobada a través de un estudio reológico de las soluciones de este polímero.

CONCLUSIONES

Luego de analizar y discutir los resultados de este estudio se pueden arribar a las siguientes conclusiones:

1. El alginato de sodio de procedencia nacional posee un peso molecular de 426 579 g/mol, mientras que el producto mexicano resultó ser una mezcla constituida por tres tipos de alginatos de diferente peso molecular: 1 584 893, 794 328 y 501 187g/mol.
2. El alginato de sodio de procedencia nacional es rico en ácido gulurónico (relación M/G = 0.56), en tanto el polímero mexicano posee mayor contenido en ácido manurónico (relación M/G = 6).
3. Ambos productos cumplen con las especificaciones físico químicas establecidas por los organismos internacionales para su empleo como aditivo alimentario, aunque el alginato cubano posee un mayor contenido de calcio.

BIBLIOGRAFÍA

- FAO. (1992). Compendium of food aditive specification. Vol. 2. FOOD AND NUTRITION PAPER. JECFA. Rome.
- Ferrer, A. (1995). Comunicación personal. Centro de Biomateriales. Universidad de La Habana. Cuba.
- Fujihara, M.; Magrimo, T. (1989). J. Chromatogr.; 465(2), (386-389).
- Gordon, G. (1990). Applications for seaweeds hydrocolloids in prepared foods. Introduction to Applied Phycology; (391-400).
- Haug, A. ; Larser, B. (1962). Quantitative determination of uronic acid composition of alginates. Acta Chem. Scand.; 16, (1908-1918).
- Indergaard, M. (1991). From ice cream to champagne: New applications for alginates. Applied Phycology Forum; Vol. 8. No. 1. May. 1991.
- Lewis, L.; Hernández, L.; Cañizares, E.; Zumbado, H. y Piñero, J. (1995). Evaluación reológica del Alginato de Sodio y sus perspectivas de utilización. Rev. Ciencia y Tecnología de Alimentos. Vol. 5, No 1/2-1995. IIIA. C. Habana. Cuba.
- Mizuno, H.; Iso, N.; Saito, T. and Nozawa, T. (1982). Bull. Japan. Soc. of Scientific Fisheries. 48 (11): 1675.
- Nishide, E.; Tsukayama, K.; Vchida, N. and Nibizawa, K. (1984). Journal of Chromatografic 465 (386-389).
- Smidrod, O. (1974). Faraday Discussions of the Chem. Soc.; 57, (103-107).
- Zumbado, H. (1999). Empleo de Alginato de Sodio obtenido de algas de arribazón como agente estabilizador en Mezclas para Helados. Rev. Alimentaria. No 304. Julio-Agosto, 1999. Madrid. España.
- Zumbado, H; González, N, Cañizares, E. (1999a). Obtención de Alginato de Sodio de calidad alimentaria a partir de algas de arribazón a las costas cubanas. Rev. Alimentaria. No 304. Julio-Agosto, 1999. Madrid. España.
- Zumbado, H; González, N, Cañizares, E. (1999b). Influencia del proceso de extracción sobre el rendimiento y la viscosidad del Alginato de Sodio obtenido a partir de algas de arribazón a las costas cubanas. Rev. Alimentaria. No 304. Julio-Agosto, 1999. Madrid. España.
- Zumbado, H; Lewis, L.; Cañizares, E. (2000). Empleo de alginato de sodio obtenido de algas de arribazón como agente espesante en la elaboración de puré de frutas. Revista Alimentaria, No 309. Enero-Febrero 2000. Madrid. España.

15.5. VALIDACIÓN DE UN MÉTODO PARA LA DETERMINACIÓN DE PATULINA EN JUGOS Y PURÉS DE FRUTAS POR HPLC.

Eyda Otero Fernández-Trevejo, José Antonio Arias Verdés y Ramón Sersa Espinoza

Fuente: *Revista Cubana Aliment Nutr 2001;15(1):20-5. Instituto de Nutrición e Higiene de los Alimentos*

RESUMEN

Se validó el método de la Association of Official Analytical Chemist (AOAC) para la determinación de patulina en jugo de manzana por cromatografía líquida de alta presión (HPLC) con detector ultravioleta a 275 nm y una columna RP18, para jugo de manzana y puré de frutas. Se empleó como fase móvil una mezcla al 10% acetonirrilo-agua con una velocidad de flujo de 2,7 mLlmin. La patulina presentó un tiempo de retención de 14,8 ± 0,3 min. La ecuación de regresión fue y = 1952,5X + 1673,5 y el coeficiente de correlación lineal de 0,9991. Se obtuvo un recobrado medio del 82,51 % y un coeficiente de variación del 3,33 % para los niveles de contaminación ensayados. La repetibilidad de una muestra contaminada con 33 μg/L de patulina fue de 3,12 μg/L. Se estableció para los jugos el límite de detección en 1,72 μg/L y el de cuantificación en 5,2 μg/L. Los purés de frutas fueron previamente diluidos y centrifugados, proponiéndose para el mango una purificación adicional por columna. Fue diseñado un control de calidad interno para el procesamiento de las muestras.

Palabras clave: PATULINA: CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA PRESION; ANALISIS DE REGRESIÓN.

INTRODUCCIÓN

La patulina es una micotoxina producida como metabolito secundario por un gran número de hongos de los géneros *Penicillium* y *Aspergillus,* entre los que se encuentra incluido el *P. expansum.* Se le confiere alta toxicidad para células de plantas y animales. Presenta carácter hepatotóxico, nefrotóxico e inmunotóxico. Aunque su carcinogenicidad no ha sido demostrada, los expertos proponen continuar los estudios en animales de experimentación en especies de no roedores.

La patulina puede detectarse en frutas, hortalizas, cereales enmohecidos y piensos, no obstante, no puede excluirse la presencia de esta micotoxina en las frutas aparentemente sanas. El grado de contaminación está relacionado con el grado de podredumbre y la patulina apenas se extiende fuera de los tejidos alterados; por consiguiente la exposición humana no es posible sino a partir de frutas elaboradas.[1,2]

Estudios realizados en diferentes países indican una moderada a alta incidencia de patulina, particularmente en productos de manzana, aunque los niveles de contaminación son generalmente bajos. Ocasionalmente, altas concentraciones de patulina se han encontrado, alcanzando 1000 μg/L o más. Varios países han

establecido un límite regulatorio de 50 μg/L, valor que recomienda la Organización Mundial de la Salud.

Varios métodos analíticos han sido publicados entre los que se encuentran la cromatografía de capa delgada con revelado de color [3-5], la cromatografía de gases con agentes derivatizantes y más recientemente la cromatografía líquida de alta presión (HPLC) con detector UV o arreglo de diodo.[6,7]

El objetivo de este trabajo fue establecer y validar un método de análisis de patulina en jugos y compotas de manzanas por HPLC con detección ultravioleta.

METODOS

Se realizó la validación del método oficial de la Association of Official Analytical Chemist (AOAC) para la determinación de patulina en jugo de manzana por HPLC,[6] según los principios del Codex.

Este método es aplicado para la detección y cuantificación de patulina en jugo de manzana y fue extrapolado a otras matrices como puré de peras y mango. La patulina fue extraída con acetato de etilo y purificada por partición en una solución de carbonato de sodio. La muestra extraída se secó con sulfato de sodio anhidro.

Después de evaporar el acetato de etilo, la patulina se redisolvió en 300 μL de fase móvil (10 % acetonitrilo-agua). Para la identificación y cuantificación se inyectaron 20 μL de extracto en un cromatógrafo líquido de alta presión Knauer, con una bomba isocrática de doble pistón acoplado a un detector Shidmazu UV-visible modelo SPD-6AV y un integrador Shidmazu modelo C R6A Chromatopac. Se empleó una columna cromatográfica de 25 cm x 4 mm, rellena con Spherisol C18 de 100 Aº y 5 μm de tamaño de partícula. La columna se almacenó con el 80 % de acetonitrilo agua bidestilada. Se trabajó con el flujo de la fase móvil en 2,7 mL/min. Se estableció la longitud de onda el detector UV a 275 nm y la sensibilidad a 0,04 unidades de absorbancia en la escala completa.

Para verificar la linealidad de la respuesta del detector UV con respecto a la concentración de patulina se construyó una curva de calibración con 4 puntos por triplicado a partir de una solución intermedia de 8,26 μg/mL, en frascos volumétricos de 10 mL con las concentraciones siguientes: 0,248; 0,496; 1.24 y 2.478 μg/mL. La determinación de la concentración del patrón de patulina para la construcción de la curva fue realizada según procedimiento de la AOAC.[8]

Para ensayar el método se emplearon muestras de 1 kg de jugo de manzana y de puré de mango, las cuales son representativas de otras frutas como pera, melocotón y fruta bomba en cuanto a las interferencias presentes. Las muestras se dividieron en 5 porciones, una porción fue utilizada como blanco muestra y las restantes fueron contaminadas con 33; 103,16; 51,63 y 21,16 μg/L. La primera porción contaminada se utilizó para los estudios de repetibilidad y el resto para conocer la exactitud del método. Cada porción de ensayo fue subdividida en muestras de 5 mL cada una. Se estableció el límite de detección como la

cantidad que equivale a 3 veces la desviación causada por el ruido de fondo de una muestra de jugo de manzana sin contaminar y el de cuantificación como 3 veces el límite de detección del método y se implantó un sistema de control interno de la calidad.

Los resultados fueron sometidos a tratamientos estadísticos. Se realizó una prueba de Student para determinar los límites superiores e inferiores de la pendiente de la curva de calibración, y una prueba de Duncan con un nivel de significación 5 %, para determinar si existían diferencias significativas entre los valores de recobrado obtenidos para los 3 niveles de contaminación empleados en los estudios de exactitud.

RESULTADOS

La figura 1 presenta la curva de calibración y la ecuación de regresión que relaciona las áreas promedio de cada pico calculadas por integración electrónica y la cantidad de patulina en el intervalo de 4,96 a 49,6 ng, con un coeficiente de regresión lineal de 0,9991. Los límites superior e inferior de la pendiente fueron de 2085 a 1820 respectivamente, con una varianza de 41,66.

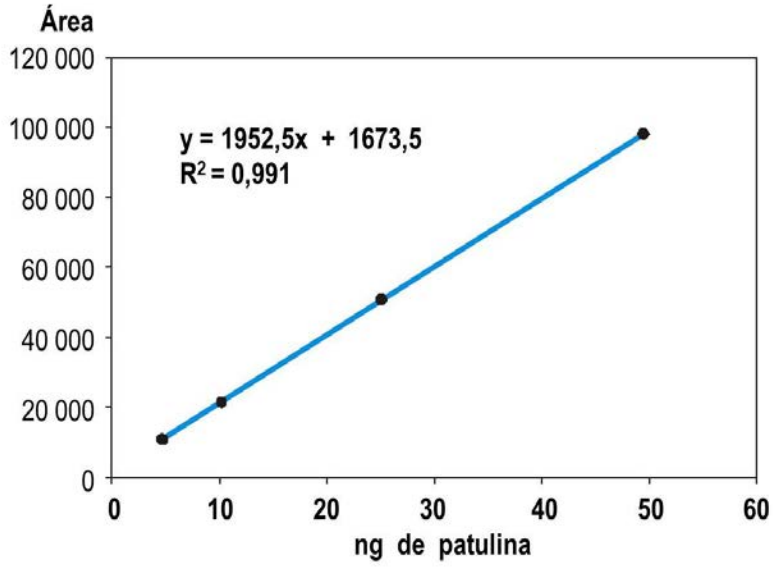


Figura 1. Curva de calibración

Bajo las condiciones descritas en este artículo, 24,8 ng de patulina producen la señal, con un tiempo de retención de 14,8 ± 0,3 min (fig. 2).

En la figura 3 se presenta un cromatograma de una muestra de jugo de manzana contaminada con 33 μg/L, donde se observa una buena resolución entre los picos del hidroximetilfurfural, HMF (contaminante natural de las frutas), la patulina y otras interferencias provenientes de la matriz y los solventes, con una repetibilidad de 3,12 μg/L y un coeficiente de variación del 5,33 %.

En la tabla 1 aparecen los recobrados de las muestras de jugo de manzana contaminadas con patulina en recorrido entre 21,16 a 103,26 μg/L. Los valores de recuperación media se encontraron entre 81,09 y 83,54 %, con un coeficiente

de variación máximo del 3,49 %. Entre las medias de los 3 niveles de contaminación, no hubo diferencias significativas, estableciéndose un recobrado medio 82,51 %, una desviación típica de 2,74 y un coeficiente de variación de 3,33 %.

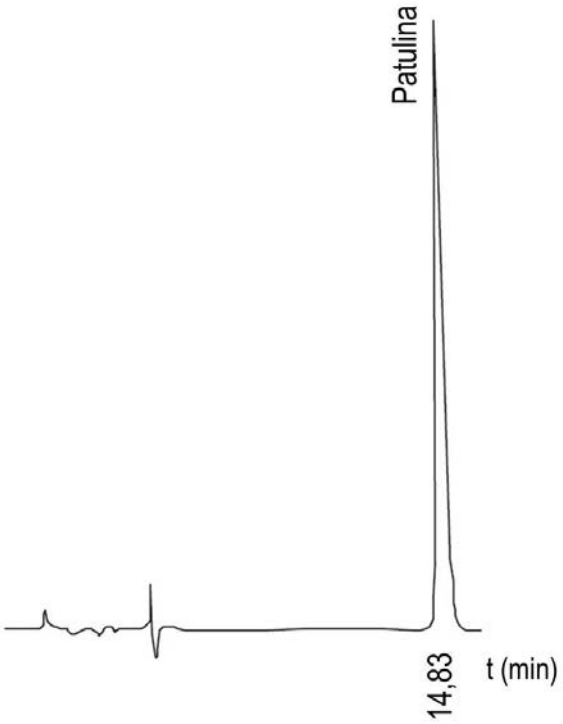


Figura 2. Cromatograma de un patrón de 24,8 ng de patulina.

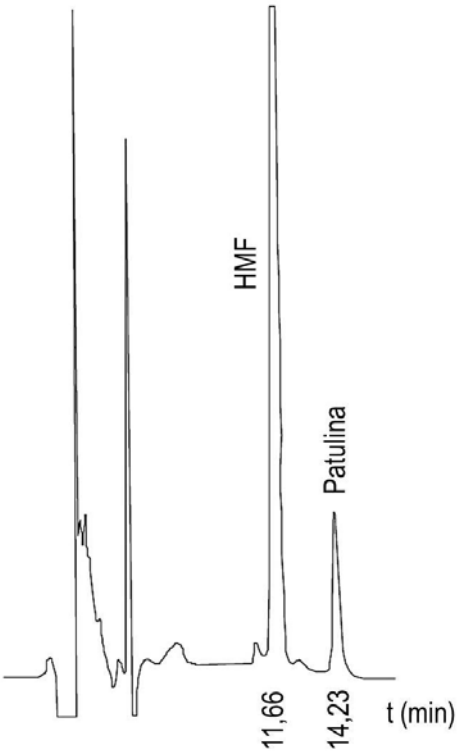


Figura 3. Cromatograma de una muestra de jugo de manzana contaminada con 3 μg/L.

Tabla 1

Recobrados de patulina en jugo de manzana

Parámetros	Niveles de contaminación		
	103,26 μg/L	**51,63 μg/L**	**21,16 μg/L**
Valor medio (μg/L)	85,71	42,81	17,16
Porcentaje de recuperación	83,54	82,91	81,09
Desviación estándar	1,96	2,89	1,78
CV (%)	2,36	3,49	2,19

El límite de detección y cuantificación se estableció en 1,72 Y 5,16 μg/L de patulina, respectivamente para los jugos de manzana, pera y melocotón.

Una muestra de jugo de manzana de 25 μg/L de patulina enviada como material de referencia, para el estudio intercalibración FAPAS, dio como resultado 25,3

μg/L de patulina, muy cercano al valor real, lo cual demuestra la competencia técnica del método.[10]

En el procesamiento de las muestras de puré de mango y pera fue necesario diluir con 5 mL de agua y centrifugar a 3000 r.p.m. durante 15 min para eliminar los sólidos disueltos y otras interferencias previo a la extracción; a pesar de ello, en el mango continuaron presentes interferencias asociadas con determinados pigmentos que impedían una adecuada separación de los picos, por lo que fue necesario realizar una segunda purificación de los extractos mediante cartuchos de 1 g de silicagel. El extracto se pasó por columna disuelto en 2 mL de tolueno. La patulina fue eluida con una mezcla tolueno-acetato de etilo 70:30. Después de evaporar el solvente, se reconstruyeron las muestras en 600 μL de fase móvil. Los límites de detección y cuantificación establecidos para estos casos fueron de 3,45 y 10,4 μg/L respectivamente.

DISCUSIÓN

El tiempo de retención de la patulina se retrasó debido a cambios en la composición de la fase móvil dados por la evaporación del acetonitrilo al ser sometido a la desgasificación, lo cual se resolvió ajustando la concentración de dicha fase.

El método validado muestra mejor precisión que el informado en otro estudio (8,6 %) que utilizó una muestra de jugo de manzana contaminada con 30 μg/L de patulina, determinada por HPLC con detector de arreglo de diodo. [9]

Dicho método presentó porcentajes de recuperación similares a los informados por otros autores,[3,4,6] que incluyen la cromatografía en capa fina. Recuperaciones entre 90 y 101 % aparecen en la literatura, pero con coeficientes de variación más elevados. [9-11]

El límite de cuantificación es similar al del método oficial suizo[1] y está por debajo del método oficial francés[1] que utiliza en la purificación columnas de silicagel.

En las muestras contaminadas de jugos y purés que permanecieron un tiempo mayor de 2 min en contacto con la solución de carbonato de sodio, se presentaron recobrados con valores entre 50 y 60 %. Otras pérdidas fueron observadas cuando la evaporación del solvente llegaba a sequedad en un evaporador rotatorio, siendo más conveniente una segunda etapa de secado bajo corriente de nitrógeno. Estas 2 afectaciones en el recobrado se establecieron como los puntos críticos de control del método.

Para determinar patulina en jugos y puré de frutas, el método descrito es rápido, simple, sensible, confiable y adecuado. Se recomienda que para procesar 10 muestras de jugo o puré se realice en paralelo 1 blanco y 2 duplicados de una muestra contaminada con un nivel de 50 μg/L de patulina, cuyos recobrados deben encontrarse entre 79 y 85 % con un coeficiente de variación entre los duplicados menor del 5 %.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Programa Conjunto FAO/OMS sobre Normas Alimentarias. Comité del Codex sobre aditivos alimentarios y contaminantes en los alimentos 29ª reunión, La Haya, Países Bajos Marzo 17-21 de 1997: 1-7. Documento de Síntesis Relativo a la Patulina. Oficina Conjunta: Vía delle Terme di Caracalla 00100 Roma. CX/FAC 97/23-Parte II Enero de 1997.
2. Programa Conjunto FAO/OMS sobre Normas Alimentarias. Comité del Codex sobre aditivos alimentarios y contaminantes en los alimentos. 30ª reunión, La Haya, Países Bajos Marzo 5-13 de 1998: 1-9 Documento de Síntesis Relativo a la Patulina. Oficina Conjunta: Vía delle Tenue di Caracalla 00100 Roma CX/FAC 98/17. Enero de 1998.
3. Scott PM, Kenedy BPC. Improved method for the Thin layer chromatographic determination of patulin in apple juice. JAOAC 1973; 56(4):813-6.
4. Scott PM. Collaborative study of a chromatographic method for determination of patulin apple juice. JAOAC 1974; 57 (3)62 1-5.
5. Siriwardana MG, Lafont P. Determination of mycophenolic acid, penicillic acid, patulin, sterigmatocystin and aflatoxin in cheese. J Dairy Sci 1979; 2(7): 1145-8.
6. Brauce AR, Burke J, Tanner A, Hammack S, Woodward BB, Post S, et al. Determination of patulin in apple juice by liquid chromatography JAOAC Int 1996;79(2):451-5.
7. Stray H. High pressure liquid chromatographic determination of patulin in apple juice. J Assoc Off Anal Chem 1978; 61(6):1359-62.
8. Helrich K, ed. Official Methods of Analysis of the AOAC. 5 ed. Arlington: AOAC, 1990;12: 1185-6, 1209-10.
9. Machinski JM, Flavio MA. Validation of a simple and sensitive HPLC method for patulin in apple juice. Alimentaria 1998; 23: 3-5.
10. Report to Participants in the Food Analysis Performance Assessment Scheme FAPAS. Patulin Analysis. Series XVI, Round 8, No. 1608. Distributed by Ken Mathieson. Central Science Laboratory, Sand, Hutton, York Y041 ILZ, UK. April 2000.
11. ISO 8128-2: 1993 International Standard Organization (1993). Apple juice, apple juice concentration and drinks containing apple juice. Determination of patulin content Part 2: Method using thin layer chromatography.

15.6. CAROTENOIDES SÉRICOS Y SU RELACIÓN CON LA DIETA EN UN GRUPO DE ADULTOS CUBANOS

Consuelo Macías Matos,[1] Florian Schweigert,[2] Graciela Serrano Sintes,[3] Gisela Pita Rodríguez,[4] Andrea Hurtienne,[2] Denia Reyes,[5] y Elsa Alonso Jiménez[5]

Fuente: *Revista Cubana Aliment Nutr 2002;16(2):105-13. Instituto de Nutrición e Higiene de los Alimentos*

RESUMEN

El objetivo del trabajo fue obtener el perfil de carotenoides séricos en un grupo de adultos cubanos aparentemente sanos y relacionarlo con la ingesta dietética. En el estudio participaron 30 voluntarios (20 mujeres y 10 hombres) con edades comprendidas entre 22 y 53 años. Se les tomó una muestra de sangre para las determinaciones de carotenoides y vitamina A en el suero por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC); paralelamente se les realizó una encuesta de frecuencia de consumo semicuantitativa que recogía la información de los alimentos consumidos los 30 días precedentes. La encuesta incluyó 38 alimentos ricos en vitamina A y carotenoides, 26 de origen vegetal y 12 de origen animal. Se hizo un estimado de los alimentos de mayor consumo y su aporte en carotenoides provitamina A y no provitamina A, así como el de vitamina A y la ingestión media de carotenoides. Los niveles medios de ingestión fueron licopeno 6,86 mg/día (dado por el consumo de tomate y papaya), betacaroteno 2,81 mg/día (principalmente tomate y zanahoria), luteína 0,79 mg/día (calabaza y chícharos), zeaxantina 0,12 µg/día (naranjas), betacriptoxantina 1,38 mg/día (naranja y papaya) y alfacaroteno 0,60 mg/día (zanahoria y plátanos). Las medias de los carotenoides séricos fueron: licopeno 38,14 ± 15,94 µg/dL; betacaroteno 16,64 ± 6,36 µg/dL; luteína 16,20 ± 7,61 µg/dL; betacriptoxantina 8,33 ± 6,03 µg/dL; alfacaroteno 6,48 ± 3,42 mg/dL y zeaxantina 2,30 ± 0,91 µg/dL. El perfil de carotenoides estuvo caracterizado por una elevada concentración de licopeno y alfacaroteno por un abundante consumo de tomate y plátanos respectivamente sobre los valores habituales relacionado con el consumo. Se encontró correlación entre la ingesta y los niveles séricos para los carotenoides provitamina A y la zeaxantina. Este resultado permite utilizar con buena precisión la encuesta de frecuencia de consumo en estudios epidemiológicos para la estimación de los carotenoides.

Palabras clave: CAROTENOIDES/sangre; VITAMINAS EN LA DIETA; FRUTAS; VEGETALES; ANTIOXIDANTES; VITAMINA A/sangre.

[1] Doctora en Ciencias Químicas. Licenciada en Bioquímica. Investigadora Titular. [2] Institut für Ernährungswissenschaft, Uni Potsdam. Alemania. [3] Licenciada en Alimentos. Especialista. [4] Doctora en Medicina. Especialista de II Grado en Bioquímica Clínica. Investigadora Auxiliar. [5] Técnica de Laboratorio.

INTRODUCCIÓN

Los carotenoides son un grupo de pigmentos naturales liposolubles que el ser humano no es capaz de sintetizar y necesita adquirirlos por medio de la dieta. Se encuentran fundamentalmente en las frutas y los vegetales y les proporcionan coloración amarilla, anaranjada y roja que a veces se enmascara por el color de la clorofila dando coloración verde oscura como ocurre en algunos vegetales de hojas.

En estudios epidemiológicos recientes se ha demostrado una asociación entre niveles elevados de carotenoides en la dieta o en sangre y un efecto protector contra el desarrollo de enfermedades crónicas como ciertos tipos de cáncer, enfermedades cardiovasculares, enfermedades degenerativas de la mácula y cataratas.[1-6] Este hecho, sumado a la función de algunos de estos compuestos como precursores de la vitamina A provoca un interés creciente.

El perfil de carotenoides séricos está determinado fundamentalmente por la dieta. Por lo tanto, cambia con la época del año y se manifiestan características por países.[7-11] En el suero humano se han identificado, gracias a la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), unos 20 carotenoides, muchos de ellos isómeros.[12] Generalmente se cuantifican 6 que se encuentran mayoritariamente en todos los individuos de distintos países y son: alfa-caroteno, beta-caroteno, beta-criptoxantina, luteína, zeaxantina y licopeno. Todos ellos tienen actividad como antioxidantes y solo los 3 primeros son precursores de la vitamina A.

El objetivo del presente estudio fue caracterizar el perfil de carotenoides en sangre de un grupo de adultos cubanos aparentemente sanos, identificar los alimentos que contribuyen a la ingestión de cada carotenoide y relacionar los valores séricos con los de la dieta. Este estudio constituye

el paso inicial en la adquisición de datos de carotenoides individuales en la población cubana para posteriormente evaluar cambios en las fracciones en relación con diferentes enfermedades crónicas.

MÉTODOS

El estudio se realizó en febrero de 1998 y participaron 30 voluntarios cubanos (20 mujeres y 10 hombres) con edades comprendidas entre 22 y 53 a (media = 36 a).

De cada participante se tomó una muestra de sangre en ayunas por punción de la vena antecubital. La sangre se recogió en tubos con anticoagulante (EDTA), se centrifugó y el plasma se dispensó en microtubos con tapa que se cerraron después de pasarle una corriente de nitrógeno. Las muestras se guardaron a -75 ^{o}C y se mantuvieron congeladas y protegidas de la luz durante el traslado al Instituto de Nutrición de Potsdam.

A 200 µL de plasma se le añadieron 200 µL de etanol para precipitar las proteínas; seguidamente se extrajo con 1 mL de n-hexano y se agitó durante 10 min.

Se centrifugó y la capa orgánica superior fue transferida a otro tubo de ensayo. El proceso de extracción se repitió, se unieron ambos extractos y se evaporaron a sequedad bajo corriente de nitrógeno. El residuo fue resuspendido en 200 µL de isopropanol y se puso en baño ultrasónico durante 5 min.

Se determinaron 6 carotenoides: luteína, zeaxantina, beta-criptoxantina, alfa-caroteno, beta-caroteno y licopeno y el retinol plasmático por HPLC según un método de gradiente en fase reversa[13] en una columna C30 (5 mm, 250 × 4,6mm; YMC, Wilmington, USA). El sistema de HPLC consistió en 2 bombas Waters Modelo 515 operando a un flujo de 1 mL/min, un inyector automático (Modelo Waters 717 plus). La mezcla de solventes comprendió:

- Solvente A: metanol (Roth Chemicals Germany), metil-terbutil-eter (Sigma Deisenhofen, Alemania) y agua con 1,5 % de acetato de amonio 85:15:2.
- Solvente B: metanol, metil-terbutil-eter y agua (8:90:2).

El gradiente de elución comenzó con 100 % del solvente A, pasando a 93 % del mismo solvente al primer minuto, manteniéndose por 3 min, seguido de un gradiente lineal de 45 % de A por 17 min y manteniéndose a 45 % durante 1 min, entonces lineal durante 11 min hasta alcanzar 5 % de A donde se mantuvo por 4 min, finalizó regresando a 100 % de A en 2 min. Al finalizar el gradiente la columna se reequilibró con 100 % del solvente A durante 10 min. En la figura 1 se muestra el cromatograma tipo donde se puede observar la separación de los carotenoides.

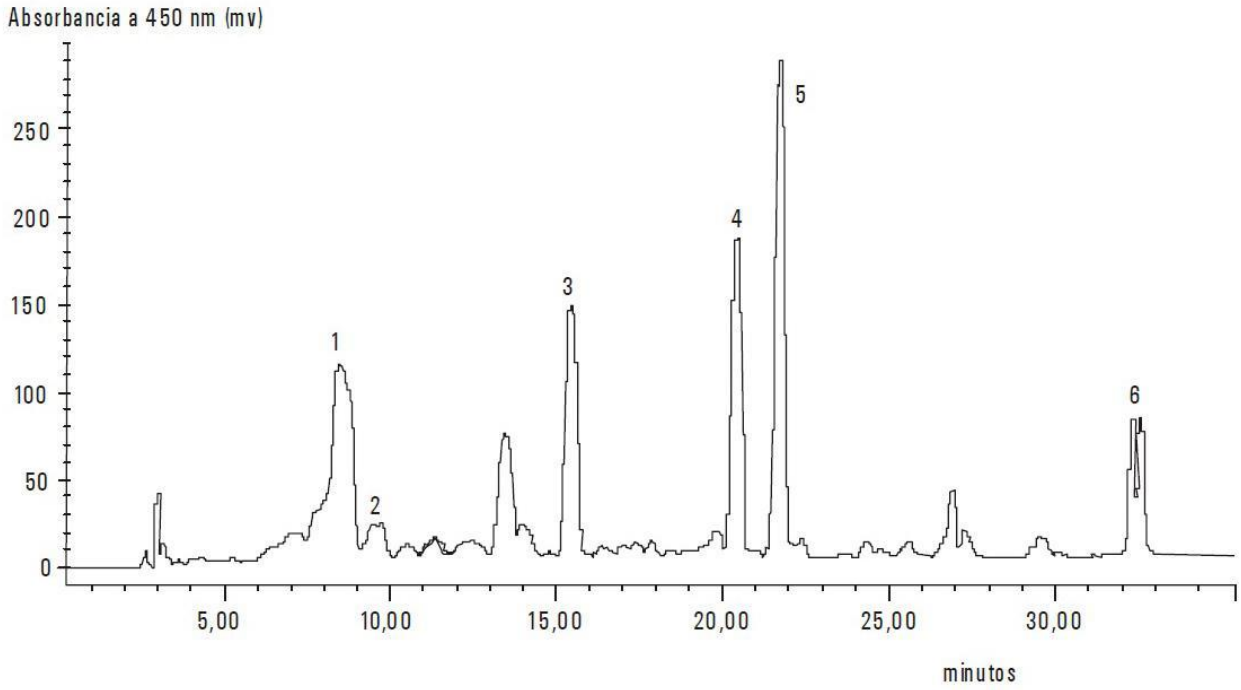


Figura 1. Cromatograma de los principales carotenoides del plasma de uno de los individuos estudiados. Los picos numerados corresponden a: 1) luteína, 2) zeaxantina, 3) beta-criptoxantina, 4) alfa-caroteno, 5) beta-caroteno y 6) licopeno.

Para la detección y caracterización de los picos se usó un detector de arreglo de fotodiodo (Modelo Waters 996). Los carotenoides y el retinol fueron cuantificados midiendo su absorción a 450 y 325 nm respectivamente. Los tiempos de retención se compararon con estándares externos. Los estándares externos de luteína, zeaxantina, beta-criptoxantina y licopeno fueron obsequiados por Hoffmann-La Roche, de Suiza, y alfa-caroteno, beta-caroteno, retinol y plamitato de retinol fueron de Sigma, Deisenhofen, Alemania.

El mismo día de la toma de la muestra de sangre se realizó una encuesta de frecuencia semicuantitativa de consumo que recogía la información de los 30 d precedentes, correspondiendo a la época del año de mayor disponibilidad de frutas y vegetales. La encuesta incluía 38 alimentos ricos en vitamina A y carotenoides, 26 de origen vegetal y 12 de origen animal. Los datos primarios se recogieron en términos de medidas caseras, las cuales fueron llevadas a gramos.

La conversión de la ingestión de alimentos a cantidades de carotenoides se realizó mediante el sistema computadorizado CERES.[14]

Las concentraciones de los carotenoides individuales se estimaron a partir de la unificación de los datos de una base española[15] y otra que comprende datos de diferentes países recopilada por especialistas del Instituto de Nutrición de Wageningen.[16] De acuerdo con ellas solamente se computan los alimentos de origen vegetal. Con estos datos se creó una tabla auxiliar de carotenoides. Los valores se expresaron en µg/100 g de alimentos.

Por su estrecha relación con los carotenoides se realizó adicionalmente el análisis de la vitamina A para el cual se incluyeron todos los alimentos encuestados. Los porcentajes de adecuación de la ingestión de vitamina A se calcularon a partir de las Recomendaciones Nutricionales y Guía de Alimentación para la población cubana,[17] considerando valores entre 90 y 110 % como adecuados, entre 70 y 90 % bajos y menores de 70 % inadecuados.

Se seleccionaron los alimentos consumidos por más del 50 % del grupo y se calculó el consumo medio (gramo por día) y un estimado de su aporte en carotenoides provitamina A y no provitamina A, así como el aporte de vitamina A.

Los resultados de la ingestión dietética y los valores en plasma se exponen como media y desviación estándar; por la elevada variabilidad en ambos casos se incluyen los valores de la mediana. Se realizó el cálculo de la correlación entre carotenoides séricos y en la dieta utilizando el coeficiente de correlación de Pearson con un nivel de confiabilidad del 95 %.

RESULTADOS

En la tabla 1 se presentan los alimentos ricos en carotenoides y vitamina A de mayor consumo. Solamente una tercera parte de los alimentos que se incluyeron en la encuesta fueron consumidos por más del 50 % del grupo de estudio.

Tabla 1.

Frutas y vegetales ricos en carotenoides de mayor consumo por un grupo de adultos cubanos sanos. Febrero, 1998

Alimento	% de consumidores	
	n=30	g/persona/d
Tomate	100	155
Naranja	97	135
Chícharos	97	61
Plátano fruta	77	40
Papaya	70	67
Zanahoria	70	24
Plátano "vianda"	70	47
Calabaza	56	17
Lechuga	56	9

La contribución específica de las frutas y los vegetales a la ingestión de cada carotenoide se muestra en la tabla 2. El beta-caroteno, principal carotenoide provitamina A, por su amplia distribución en los alimentos fue aportado por casi todos los alimentos que se incluyeron en la encuesta, aunque solo el tomate y la zanahoria contribuyeron en más del 50 %; el primero por las cantidades tan elevadas en que fue consumido y el segundo por su alto contenido. Al alfa-caroteno contribuyeron los plátanos, que caracterizan la dieta cubana, y la zanahoria. El 82 % de la ingestión de beta-criptoxantina fue debido a la naranja y la frutabomba.

Con respecto a la ingestión de carotenoides no provitamina A, los principales responsables de la ingestión de luteína y zeaxantina fueron la naranja, la calabaza y el chícharo, mientras que el aporte total de licopeno se debió a solo 3 alimentos: tomate, papaya y guayaba. Otros contribuyentes potenciales hubieran sido la toronja rosada y el melón de agua pero fueron muy poco consumidos. El huevo, que tiene un alto contenido de luteína, fue consumido por todo el grupo de estudio, pero no se computó ya que no está incluido en las bases de datos usadas.

Los mismos alimentos citados anteriormente como contribuyentes de carotenoides provitamina A fueron los principales responsables de la ingestión de vitamina A además del hígado y los huevos (tabla 2).

La tabla 3 muestra las cantidades ingeridas de los carotenoides y de la vitamina A. Se destacó el valor extremadamente alto del licopeno (mediana = 5,58 mg/d) y como consecuencia el valor elevado de los carotenoides totales (10,9 mg/d). La media y la mediana de la vitamina A se encontraron por encima de las cantidades recomendadas, aunque el 40 % del grupo tuvo ingestiones consideradas como inadecuadas.

Tabla 2.

Contribución de alimentos a la ingestión de carotenoides y vitamina A en un grupo de adultos cubanos sanos. (Expresado en término de porcentaje). Febrero, 1998

Alimento	Carotenoides provitamina			Carotenoides no provitamina A			
	Beta criptoxantina	Alfacaroteno	Beta caroteno A	Luteína	Zeaxantina	Licopeno	Vitamina A
Tomate			30	12		78	18
Naranja	54	9	5	9	65		5
Chícharo		5	5	29			
Plátano fruta		10					7
Papaya	28					16	5
Zanahoria		52	26	6			14
Plátano "vianda"		18					5
Calabaza	6		6	28	22		
Mandarina	6						
Maíz				8			
Guayaba						5	
Hígado							11
Huevos							7

Contribución mínima 5 %

Tabla 3.

Ingestión de carotenoides y retinol en un grupo de adultos cubanos aparentemente sanos (mg/d)

	Media (DE)	Mínimo	Máximo	Mediana
Luteína	0,789 (0,861)	0,008	3,642	0,569
Zeaxantina	0,124 (0,136)	0,000	0,680	0,079
Beta-criptoxantina	1,378 (1,433)	0,102	4,805	0,751
Alfa-caroteno	0,600 (0,694)	0,005	3,389	0,434
Beta-caroteno	2,813 (2,222)	0,405	8,992	2,198
Licopeno	6,855 (5,536)	0,482	23,563	5,581
Carotenoides totales	13,476 (2,195)	7,811	36,348	10,916
Vitamina A	0,919 (0,591)	0,055	2,576	0,826

n= 30

En la tabla 4 se observan las concentraciones plasmáticas de los carotenoides y de la vitamina A. La fracción principal la constituyó el licopeno (46 %), seguido por el beta-caroteno (20 %) y la luteína (16 %). No se encontró ningún individuo con valores deficientes de vitamina A (<20 µg/dL), inclusive el mínimo estuvo por incima del valor (30 mg/dL) que se considera representativo de un estado nutricional adecuado de esta vitamina.

Al correlacionar los valores del plasma con la ingestión dietética se encontró que

el alfa-caroteno presentaba la mayor correlación (r = 0,52; p<0,001). También tuvieron una correlación significativa para p<0,05 el beta-caroteno (r = 0,47), la zeaxantina (r = 0,46), la beta-criptoxantina (r = 0,41) y los carotenoides totales (r = 0,44). No se encontró correlación significativa para la luteína (r = 0,31), el licopeno (r = 0,16) ni la vitamina A (r = 0,10).

Tabla 4.

Valores de carotenoides y retinol plasmático en un grupo de adultos cubanos aparentemente sanos (µg/dL)

	Media (DE)	Mínimo-Máximo	Mediana
Luteína	16,20 (7,61)	5,86-41,13	13,11
Zeaxantina	2,30 (0,91)	0,91-4,44	1,99
Beta-criptoxantina	8,33 (6,03)	1,60-28,81	6,33
Alfa-caroteno	6,48 (3,42)	2,14-17,34	5,66
Beta-caroteno	16,64 (6,36)	7,14-30,76	15,33
Licopeno	38,14 (15,94)	16,35-92,00	23,01
Carotenoides totales	88,09 (20,14)	33,36-119,17	71,53
Vitamina A	52,54 (11,39)	30,23-83,02	51,77

n= 30

DISCUSIÓN

Se aprecia poca variedad en el consumo de frutas y vegetales. Alimentos ricos en carotenoides, como los vegetales de hojas verdes, el pimiento y el melón de agua, disponibles en el mercado en la época encuestada, fueron de bajo consumo. Las causas parecen ser la falta de hábito y la poca accesibilidad.

Las cantidades absolutas y la proporción en que se encuentran los carotenoides en el plasma varían para cada país en dependencia de las fuentes de alimento y de sus hábitos dietéticos. Mientras que el perfil de carotenoides séricos de los españoles lo caracteriza una fracción particularmente elevada de beta-criptoxantina por el consumo de naranjas y mandarinas,[18] y el de Francia, Alemania y otros países la fracción de beta-caroteno y luteína por el consumo de vegetales de hojas verdes y zanahoria;[10,19,20] en el estudio realizado se destaca una predominante fracción de licopeno por un consumo elevado de tomate y una fracción de alfa-caroteno con valores superiores a los habituales en la literatura por el consumo de plátano, alimento típico de la dieta cubana.

El licopeno constituye la fracción principal en el plasma de individuos de la mayoría de los países de cultura occidental.[9,10,20,21] Por el contrario, esta fracción no aparece en estudios realizados en la región de Linxian en China y su ausencia en el suero, unido a las bajas concentraciones de otros antioxidantes, se relaciona con una incidencia elevada de cáncer de esófago y estómago.[22]

En el presente estudio, el licopeno no solo constituye la fracción principal sino también se observa que sus valores medios absolutos en plasma son superiores a los informados en la literatura, inclusive a los de países como Italia, Estados Unidos e Inglaterra[8,10,21] donde el tomate forma parte del menú diario. Los valores medios de ingestión también sobrepasan los informados en la literatura.[8,21] La época del año en que se realizó la toma de muestra y encuesta dietética coincidió con el "pico" de la cosecha de tomate. Todos los encuestados refirieron haber consumido tomate durante el mes anterior, muchos de ellos entre 6 y 10 unidades por día.

La ingestión y las concentraciones en plasma presentaron valores más bajos para el beta-caroteno y semejantes para la luteína a los de otros países.[7-11]

Se encontró una tendencia a concentraciones más elevadas de los carotenoides provitamina A en las mujeres que en los hombres, tal y como se reporta en la literatura,[7,10,11] pero no se llevó a cabo el análisis estadístico por lo pequeño de la muestra.

La variabilidad tanto de los niveles de ingesta como de los valores séricos es muy alta para todas las fracciones, lo cual está descrito en la literatura y se explica porque depende de lo que ingiere cada individuo en cantidad y tipo de alimento y de otros factores como absorción, sexo e índice de masa corporal.

El haber encontrado correlación entre los valores del suero y la dieta para 4 de los 6 carotenoides analizados permite utilizar con buena precisión la encuesta de frecuencia de consumo en estudios epidemiológicos para la estimación de los carotenoides. La falta de significación estadística para la luteína, puede deberse a que no se computó el huevo, rico en este carotenoide, por no aparecer en las bases de datos utilizadas. Otros autores que no encontraron correlación para el licopeno, consideran que esto puede deberse a que las concentraciones plasmáticas de este carotenoide reflejan la ingestión a medio o largo plazo más que a corto plazo como sucede para el beta-caroteno.[23]

Los valores normales del retinol plasmático parecen responder a que el 53 % del grupo ingería suplementos que contienen vitamina A, ya que solo el 50 % cubría las recomendaciones diarias.

El grupo estudiado no pretende ser representativo de la población cubana. Sin embargo, los resultados obtenidos están apoyados por otros estudios dietéticos realizados en la misma época del año en distintos grupos de población donde se aplicó igual o similar encuesta de frecuencia de consumo[24,25] (Marrero García M. Estimación de la ingestión de carotenoides en adolescentes de la Secundaria Básica de la localidad de Alamar; Reyes ME. Estimación de la ingestión de carotenoides en adultos de Ciudad de La Habana; Abreu MM. Estimación de la ingestión de carotenoides en adultos sanos del municipio Ranchuelo. Tesis de maestría de Nutrición en Salud Pública. 2000).

AGRADECIMIENTOS

Este estudio se realizó gracias al apoyo financiero brindado por la Oficina Alemana de Intercambio Científico (DAAD). Los autores agradecen a los voluntarios que participaron en el estudio y al Laboratorio de Dietética del Instituto de Nutrición e Higiene de los Alimentos (INHA) por la asistencia técnica en la evaluación de las dietas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Byers T, Perry G. Dietary Carotenes, Vitamin C, and Vitamin E as protective Antioxidants in Human Cancers. Annu Rev Nutr 1992;12:139-59.
2. Abdula M, Gruber P. Role of diet modification in cancer prevention. Biofactors 2000;12:45-51.
3. Kohlmeier L, Hastings SB. Epidemiological evidence of a role carotenoids in cardiovascular disease prevention. Am J Clin Nutr 1995;62:1370S-6S.
4. Yeum KJ, Taylor A, Tang G, Russell R. Measurement of Carotenoids, Retinoids, and Tocopherols in Human Lenses. Invest Ophthalmol Vis Sci 1995;36:2756-61.
5. Schalch W. Lutein and zeaxanthin, the carotenoids of the human macula. Sight Life Newsletter 2000;2:3-10.
6. Edge R, Mc Garvey DJ, Truscott TG. The carotenoids as anti-oxidants –A review. J Photoch Photobiol B Biology 1997;41:189-200.
7. Olmedilla B, Granado F, Blanco I, Rojas-Hidalgo E. Seasonal and sex-related variations in six serum carotenoids, retinol, and alpha-tocopherol. Am J Clin Nutr 1994;60:160-10.
8. Scott KJ, Thurnham DI, Hart DJ, Bingham SA, Day K. The correlation between the intake of lutein, lycopene and ß-carotene from vegetables and fruits, and blood plasma concentrations in a group of women aged 50-65 years in the UK. Br J Nutr 1996;75:409-18.
9. Brady WE. Human serum carotenoid concentrations are related to physiologic and lifestyle factors. J Nutr 1996;126:129-37.
10. Steghens JP. Simultaneous measurement of seven carotenoids, retinol and alpha-tocopherol in serum by HPLC. J Chromatogr B 1997; 694:71-81.
11. Yeum KJ. Human plasma carotenoid response to the ingestion of controlled diets high in fruits and vegetables. Am J Clin Nutr 1996;64:594-602.
12. Khachik F, Spangler CJ, Smith JC. Identification. Quantification, and Relative Concentrations of Carotenoids and their Metabolites in Human Milk and Serum. Anal Chem 1997;69:1873-81.
13. Schweigert FJ, Hurtienne, Bathe K. Improved Extraction Procedure for Carotenoids from Human Milk. Int J Vitam Nutr Res 2000;70(3);79-83.
14. FAO. Organization de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimetación. CERES: Evaluación del consumo de alimentos en América Latina y el Caribe. Manual del usuario. La Habana: FAO;1998.
15. Contenido de carotenoides en verduras y frutas de mayor consumo en España.

Madrid: INSALUD; 1996.

16. West CE, Poortvliet EJ. The carotenoid content of foods with special reference to developing countries. Arlington: ED. VITAL;1993.

17. Porrata Maury C, Hernández Triana M, Argüelles Vázquez JM. Recomendaciones nutricionales y guías alimentarias de la población cubana. La Habana: Pueblo y Educación; 1996.

18. Granado F, Olmedilla B, Blanco I, Rojas-Hidalgo E. Major fruit and vegetables contributors to the main serum carotenoids in Spanish diet. Europ J Clin Nutr 1996;50:246-50.

19. Müller H. Die tägliche Aufnahme von Carotinoiden (Carotine und Xanthophylle) aus Gesamtnahrungsproben und die Carotinoidgehalte ausgewählter Gemüse und Obstarten. Z Ernährungswiss 1996;35:45-50.

20. Olmedilla B, Granado F, Southon S. Serum concentrations of carotenoids and vitamins A, E, and C in control subjects from five European countries. Br J Nutr 2001;85:227-38.

21. Rojas-Hidalgo E, Olmedilla B. Flair Concerted Action No. 10 Status Papers. Carotenoids. Internat J Vit Nutr Res 1993;265-9.

22. Yang CS. Vitamin A and other deficiencies in Linxian, a high esophageal cancer incidence area in northern China. J Natl Cancer Inst 1984;73:1449-53.

23. Ascherio A. Correlations of Vitamin A and E Intakes with the Plasma Concentrations of Carotenoids and Tocopherols among American Men and Women. J Nutr 1992;122:1792-1801.

24. Macías C, Pita G. Pérez A, Reboso J, Serrano G. Evaluación nutricional de niños de 1 a 5 años de edad en un consultorio médico de la familia. Rev Cubana Aliment Nutr 1999;13:85-90.

25. Pita G, Macías C, Pérez A, Serrano G, Reboso J. Evaluación nutricional de un grupo de adultos mayores en un consultorio médico de familia. Rev Cubana Aliment Nutr 1999;13:91-97.

15.7. OCURRENCIA DE AFLATOXINA M_1 EN LECHES CRUDA, ULTRAPASTEURIZADA Y ORGÁNICA PRODUCIDAS Y COMERCIALIZADAS EN EL ALTIPLANO MEXICANO

J. Pérez[1], R. Gutiérrez[1], S. Vega[1], G. Díaz[1], G. Urbán[1], M. Coronado[1] y A. Escobar[2]*

[1]*Departamento de Producción Agrícola y Animal. Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco, México, D. F.*

[2]*Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA), Apartado 10, San José de las Lajas, La Habana, Cuba*

Fuente: *Rev Salud Anim. v.30 n.2 La Habana Mayo-Ago. 2008*

RESUMEN

Muestras de leche procedentes del Altiplano Mexicano (9 cruda, 20 ultrapasteurizada y 15 orgánica) fueron analizadas para determinar la presencia de aflatoxina M_1 empleando columna de extracción de fase sólida (C18), prederivatización con ácido trifluoracético y cromatografía líquida acoplada a un detector fluorescente. Los resultados mostraron que el 59% de las muestras presentaron niveles de aflatoxina M_1 y todos los casos se encontraron por encima del límite máximo de residuo de 0.05 µg/Kg propuesto por la Unión Europea. Las medianas de aflatoxina M_1 encontradas en muestras de leche cruda, ultrapasteurizada y orgánica fueron 16.21; 16.1 y 23.1 µg/Kg respectivamente. El porcentaje de muestras por encima del límite máximo de residuo fue menor en leche de producción orgánica (20%) comparada con las leches crudas y ultrapasteurizadas que estuvieron por encima del 50 y 60% respectivamente.

Palabras clave: *aflatoxina M_1; leche orgánica; México*

INTRODUCCIÓN

Cuando los rumiantes consumen alimentos contaminados con aflatoxinas del tipo B y G, estas son metabolizadas y excretadas en la leche como aflatoxinas M_1 y M_2 (2, 37, 16). La Agencia Internacional de Investigaciones de Cáncer (IARC) ha reportado a las aflatoxinas B_1 y M_1 como posible carcinógenos humanos (19), estos reportes conjuntamente con otros que han demostrado el efecto tóxico de las aflatoxinas han llevado a que se establezcan límites máximos de residuo (LMR) en alimentos. La Unión Europea (UE) ha establecido un LMR para la aflatoxina M_1 en leche y productos lácteos de 0.05 µg/Kg (11), mientras el Codex Alimentarius de la FAO y la FDA de los Estados Unidos han propuesto valores de 0.5 µg/Kg (6, 42).

En el ámbito mundial son múltiples los reportes sobre la presencia de aflatoxina M_1 en leche y productos lácteos desde hace más de tres décadas (40, 48, 26, 35, 28, 27, 37, 33, 38, 7), tema que no ha perdido su vigencia, si se considera que la inocuidad alimentaria constituye hoy la prioridad principal de muchos países y de organismos internacionales (12).

En países de América Latina y el Caribe en la última década se ha reportado la presencia de aflatoxina M_1 en leche y productos lácteos (quesos), algunos de ellos son Argentina (24), Brasil (31, 37); Colombia (9), México (23, 4, 5) y en Trinidad y Tobago (30). En la mayor parte de los informes se evidenció una incidencia alta de aflatoxina M_1 en muestras analizadas, pero con porcentajes bajos de muestras con niveles de concentración superiores al propuesto por la UE (10).

En México los estudios de aflatoxina M_1 fueron realizados en el periodo entre 1996-1998 (5) y se desconoce cómo su comportamiento en los últimos años, además esto se agudiza ya que se ha mencionado que más del 25% de la producción de las cosechas de alimentos a nivel mundial están contaminadas con algún tipo de micotoxinas. Es de destacar que la agricultura orgánica está adquiriendo también creciente importancia en varios países en desarrollo, entre ellos México con la producción de diversos productos, entre lo que se destacan: café, granos de maíz azul y blanco, ajonjolí, hortalizas, maguey y otros (39). La ganadería orgánica recién comienza y los alimentos orgánicos constituyen una actividad comercial con buenas perspectivas a largo plazo (20,21); la definición de leche orgánica aún no se ha establecido, pero lo que se considera hasta ahora es que dicha leche proviene de una ganadería que cumple con un conjunto de requisitos y condiciones como son respeto al medio ambiente y a los animales, se evita el uso de agroquímicos y medicamentos sintéticos. El cumplimiento de estas medidas puede ser verificado por agencias certificadoras (3).

La producción anual se desconoce, pero se sabe que la superficie de la producción orgánica en México, creció de 25 000 a 220 000 hectáreas en el periodo de 1994 al 2004. De esas, alrededor del 80% están certificadas y el restante 20% en proceso de certificación (46). La superficie mundial dedicada a la producción orgánica alcanza las 22 811 267 hectáreas de los cuales el 21,4 % se encuentra en América Latina. El país que más hectáreas tiene en producción orgánica es Argentina que paradójicamente es el tercer lugar con 1.84% del total de su superficie agropecuaria, ocupando el primer lugar Uruguay con un 4% (18).

Pocas investigaciones se han conducido para evaluar la inocuidad de los alimentos orgánicos (25). En la producción orgánica no está autorizado el uso de fungicidas, por lo que es posible que aparezcan las micotoxinas como contaminantes naturales en los alimentos cuando existen condiciones climáticas propicias y, no se cumplen las buenas prácticas agrícolas de manejo y de almacenamiento. Lo anterior constituye un peligro para el sistema de producción de leche orgánica. En estudios realizados en leche orgánica y quesos producidos de la misma se ha reportado la presencia de aflatoxina M_1 (44; 17; 46).

Fue objetivo de este trabajo evaluar la presencia de aflatoxina M_1 en muestras de leche cruda, ultrapasteurizada y orgánica producidas y comercializadas en el Altiplano Mexicano.

MATERIALES Y MÉTODOS

Un total de 35 muestras de leche ultra pasteurizadas de la cuales 15 fueron orgánicas, se obtuvieron en diferentes supermercados de la Ciudad de México durante el periodo de octubre del 2006 a febrero del 2007, además 9 muestras de leche cruda se colectaron en zonas de la Ciudad de México y Texcoco en el mismo periodo. La leche cruda se transportó al laboratorio en frascos plásticos en nevera con hielo y se almacenó a 4°C hasta su análisis. Todas las muestras fueron tomadas bajo las pautas establecidas en la Guía para el Muestreo de Leche y Productos Lácteos (29) y analizadas antes de la fecha de su vencimiento.

Las muestras de leche fueron analizadas para determinar su contenido de aflatoxina M_1 por HPLC con detector de fluorescencia de acuerdo a lo establecido en el método 986.16 de la AOAC (1). La aflatoxina M_1 se extrajo de la leche previamente diluida y caliente a 80ºC sobre una columna de extracción de fase sólida C18, se lavó la columna con agua:acetonitrilo (95:5 v/v) y se eluyó la Aflatoxina M_1 con éter dietílico sobre otra columna de sílica gel (40-120 mesh), seguidamente se eluyó con diclorometano:metanol (95:5 v/v). La Aflatoxina M_1 extraída con diclorometano: metanol se llevó a sequedad por rotoevaporación. Al residuo seco se le adicionaron 100 μL de hexano y se agitó en vortex por 1 minuto, posteriormente se agregaron 50 μL de ácido trifluoroacético (TFA), se agitó nuevamente en vortex por 1 minuto y se colocó en baño térmico a 40 ºC por 30 minutos. Posteriormente se evaporó bajo nitrógeno y se resuspendió en 500 μL de la fase móvil para su análisis por HPLC. Del estándar de aflatoxina M_1 se tomaron 50 μL de la concentración conocida y se procedió de la misma forma anteriormente descrita.

Se empleó un cromatógrafo líquido de la firma comercial Merck-Hitachi con detector fluorescente (longitud de excitación y emisión de 365 y 425 nm respectivamente) y una columna de fase reversa (Lichrocart100 C18 5μm 250x0.4 cm), como fase móvil se empleó una mezcla de acetonitrilo:metanol:agua en una proporción de 20:20:60 v/v/v, el flujo fue 1 mL/min y se aplicaron 50 μL de estándar de referencia o de la muestra previamente filtrada por 0.45μm de diámetro de poro. Los cromatogramas fueron registrados usando una interfase Perkin Elmer NCI 900 y procesados con el software TOTALCHROM (Versión 6.2).

Todos los reactivos utilizados fueron de calidad reactivo de la firma comercial Burdick & Jackon y los disolventes metanol y acetonitrilo fueron grado HPLC. El ácido trifluoroacético fue de JT Baker calidad HPLC. El patrón comercial de aflatoxina M_1 fue suministrado por Sigma-Aldrich (Sigma, St Louis MO, USA) se diluyó en acetonitrilo benceno (90:10 v/v) y se comprobó su concentración midiendo su densidad óptica a 350 nm acorde con lo planteado en la AOAC (1) (Method 971.22 a-Preparación de soluciones y b-Determinación de la concentración). La columna Lichrocart RP18 (250-4.6 mm di 5μm) fue obtenida de Merck (Darmstadt Germany) y la columna de extracción de fase sólida C18 (5g) fue conseguida de Phenomenex (Strat™).

Se evaluó la eficacia del método analítico evaluando la linealidad en un intervalo de 0.1 a 1 µg/mL por triplicado en cada punto y el recobrado en muestras de leche empleando un nivel de contaminación de 40 ng/g.

Linealidad: Se procesaron cuatro concentraciones en un intervalo de 0.1, 0.25, 0.5 y 1.0 µg/mL del patrón de referencia por triplicado para determinar la pendiente, el intercepto y el coeficiente de determinación entre el área y la concentración del analito.

Para la determinación del límite de detección y cuantificación (LD, LC) se procesaron curvas en el intervalo de la determinación (0.1-1 µg/mL) y en una cercana al límite de detección (0.05, 0.1 y 0.2 µg/mL) por triplicado en cada uno de los puntos. Se procedió a determinar los valores de LD y LC y se consideraron tres y diez desviaciones estándares del blanco para (n) medidas individuales (Ecuaciones 1 y 2) (34).

Límite de detección = (Ybl + 3 Sbl) /b (1)

Límite de cuantificación = (Ybl + 10 Sb)/b (2)

donde:

Ybl = Estimado de la respuesta del blanco

Sbl = Desviación estándar del blanco

b = Pendiente de la curva de calibración.

Exactitud: Se preparó un nivel de concentración de 40 µg/Kg por triplicado para el análisis de recobrado.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la figura 1 se presenta el perfil cromatográfico de las aflatoxinas M_1 y B_1 cuando la muestra es prederivatizada con ácido trifluoroacético, con tiempos de retención de 3.08±0.10 y 5.21±0.10 respectivamente. La curva de calibración (y= 103281x **–** 5948.7) mostró una linealidad significativa ($p<0.05$) en un intervalo de 0.1 a 1 µg/Kg con un coeficiente de determinación de 0.9982. Los límites de detección y cuantificación fueron 26.5 y 30.1 ng/µL respectiva- mente. El recobrado (exactitud) de aflatoxina M_1 en leche fue de 91% para un nivel de 40 µg/Kg con una precisión del 5%. Trabajos similares donde se ha empleado este método oficial para la determinación de aflatoxina M_1 en leche muestran límite de detección de 15 ng/Kg, valores de recobrados por encima del 90% y valores de precisión entre 7-

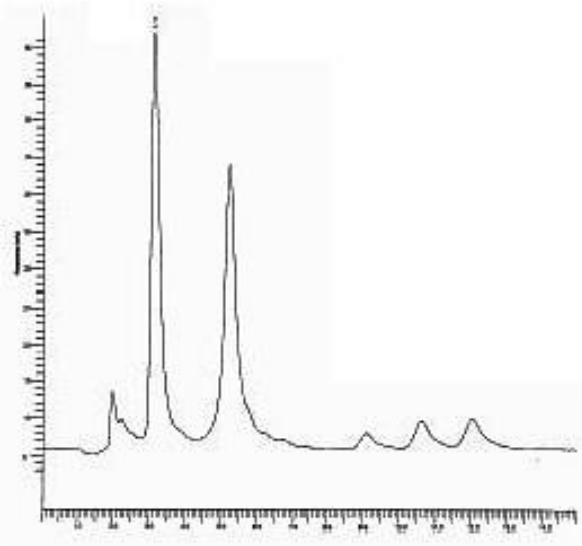


Figura 1. Perfil cromatográfico de las derivatizaciones de Aflatoxina M_1 y B_1 con ácido trifluoroacético.

9% (16; 48). Las mayores diferencias encontradas fueron en los tiempos de retención debido a cambios en la composición de la mezcla de la fase móvil, las características de la fase reversa empleada en la columna y el flujo empleado, sin embargo estos resultados obtenidos en el laboratorio muestran que el método fue eficiente para evaluar la presencia de aflatoxina M_1 en los niveles que exige la UE y la FDA para 0.05 y 0.5 µg/Kg respectivamente. Además, existe la posibilidad de proponer métodos no oficiales para el análisis de AFM_1 y validarlos bajo las pautas indicadas en la Norma ISO 17025, a través de pruebas de proeficiencia e intralaboratorio. Su aplicación se debe hacer en muestras problema, un ejemplo de ello se presenta en el trabajo de Gallo *et al*. (13).

En la tabla 1 se muestra un resumen del número de muestras en diferentes intervalos de contenidos de aflatoxina M_1 en las muestras de leches cruda, ultrapasteurizada y orgánica producidas y comercializadas en el Altiplano Mexicano, donde el 59.1% de todas las muestras presentaron niveles de aflatoxina M_1 superior al LMR establecido por la UE (10). El 20% de las muestras de leche orgánica presentaron niveles superiores al valor establecido por la UE y la FDA, mientras que los porcentajes de las muestras de leche cruda y ultrapasteurizada fueron 66 y 50%, respectivamente.

Tabla 1

Frecuencias de ocurrencia de aflatoxina M_1 en leches cruda, ultrapasteurizada y orgánica por intervalo de concentración (μg/kg).

	nd – 0,05	0,051 – 0,49	0,5 – 9,9	10 - 50	> 50
L. ultrapasteurizada (n= 20)	8	1	1	7	3
L. orgánica (n= 15)	9	1	2	2	1
L. cruda (n= 9)	1	1	1	5	1
SUMA	18	3	4	14	5
Porcentaje (%)	40,9	6,8	9,0	32,0	11,3

Los resultados logrados difieren a lo informado por Carvajal *et al.* (4) para leches pasteurizada y ultrapasteurizada. Estos investigadores encontraron contenidos de AFM_1 mayores a 0.05 µg/Kg en 13% de sus muestras estudiadas (n = 290), en tanto que en este estudio el 52.3% de las muestras (n = 44) presentaron niveles superiores a 0.05 µg/Kg, incluso la leche con categoría de orgánica presentó en 20% de los casos (n = 15) valores superiores al límite señalado, lo cual pone en evidencia que la presencia de aflatoxina M_1 en leche es una problemática actual en México.

Otros estudios realizados en los últimos 7 años en países como Brasil (16; 31); Colombia (9); Italia (13; 14; 32); Grecia (36) y Corea (22), manifiestan incidencia alta de aflatoxina M_1 en muestras de leche y productos lácteos (>75%), sin embargo los niveles de concentración (ng/Kg) son bajos y no sobrepasan en muchos de los casos los límites establecidos por la UE. En este

trabajo no obstante presentar una incidencia del 50%, las medianas obtenidas para las muestras de leches cruda y ultra pasteurizada fueron mayores al LMR. Una posible causa de estos valores pueden ser las variaciones de la humedad relativa en el ambiente, que favorecen la presencia de hongos toxigénicos en los alimentos destinados al consumo animal. Otro factor que influye en los resultados obtenidos, pudo tener como origen el consumo de granos y concentrados, donde existe una probabilidad de la presencia de estas toxinas en los mismos. La presencia de micotoxinas en México en alimentos del consumo animal y humano ha sido reportada por varias décadas (15; 8; 41; 23).

En estudios anteriores se ha podido constatar que concentraciones bajas de aflatoxina M_1 pueden deberse a la dilución de lotes altamente contaminados con numerosos lotes libres o con bajos niveles de contaminación con aflatoxina M_1, que hace que aparezca una incidencia alta con bajos niveles (32; 33).

Los análisis realizados en muestras de leche orgánica mostraron un valor de su mediana superior a los registrados para las leches cruda y pasteurizada (Tabla 2), esto pudo deberse a que el factor de dilución a que fue sometido la muestra es mucho menor, sin embargo su incidencia solo fue del 20% (Tabla 1). Los hallazgos están en correspondencia con los encontrados por otros autores, donde se plantea que la frecuencia de aparición de leche orgánica debe ser menor al resto de la leche, siempre y cuando se cumplan las buenas prácticas agropecuarias (43; 44). La producción de leche orgánica representa una opción para la agroindustria, ya que un sector de los consumidores ha modificado en los últimos años sus preferencias, en la búsqueda por encontrar en el mercado alternativas que no representan riesgos a corto y a largo plazo para su salud. No obstante, es probable que aun cuando los productores de leche cumplan con las características de la producción orgánica aprobadas y establecidas por organismos certificadores, la aflatoxina M_1 y otras sustancias tóxicas puedan estar presentes en la leche y alimentos orgánicos (45). Este estudio demuestra que la leche orgánica no está exenta de contaminarse con micotoxinas.

Tabla 2

Valores de las medianas, mínimos y máximos de los contenidos de aflatoxina M_1 (μg/kg) en leches cruda, ultrapasteurizada y orgánica comercializadas en el Altiplano Mexicano.

	L. ultrapasteurizada	L. orgánica	L. cruda
Mediana	16,1	23,1	16,2
Mínimo	0,2	0,2	0,4
Máximo	76,6	88,6	92,3

Debido a la alta incidencia de aflatoxina M_1 encontrada en el presente estudio en muestras de leche comercializadas en el Altiplano Mexicano se recomienda desarrollar un programa de pesquisaje permanente con la meta de prevenir lotes de leche contaminadas con niveles de aflatoxina M_1 por encima del nivel

regulatorio establecido en México (0.5 µg/Kg) que evite que la misma pase a la cadena alimentaria.

REFERENCIAS

1. AOAC. Aflatoxins M_1 y M_2 in fluid milk. Liquid Chromatographic Method. Method 986.16 En: *Official Method of Analysis of AOAC International 16th Edition* Volumen II Ed. Patricia Cunniff Cap. 49 Natural Toxin Peter M. Scott. 1995;34-35.
2. Battacone G, Nudda A, Palomba M, Pascale M, Nicolussi P, Pulina G. Transfer of aflatoxin B_1 from feed to milk and from milk to curd and whey in dairy sheep fed artificially contaminated concentrates. *J Dairy Sci*. 2005;88(9):3063-9. [Links]
3. Brunnet L, García L, Vega S, De León F, Castillo H. La producción de leche orgánica, una primera aproximación documental. En: Cavallotti B., Palacios B. En: Ganadería mexicana en el nuevo milenio. Situación, alternativas productivas y nuevos mercados. Universidad Autónoma Chapingo, Estado de México. 2003;231-239.
4. Carvajal M, Rojo F, Méndez I, Bolaños A. Aflatoxin B_1 and its interconverting metabolite aflatoxicol in milk: the situation in Mexico. *Food Addit Contam*. 2003;20(11):1077-86.
5. Carvajal M, Bolaños A, Rojo F, Méndez I. Aflatoxin M_1 in pasteurizad and ultrapasteurized milk with different fat content in Mexico. *J Food Prot.* 2003;66(10):1885-92.
6. Codex Alimentarius. General Standard for Contaminants and Toxins in Foods. Codex Standard 193-195. Annex IV-B (Rome: Food and Agriculture Organization and World Health Organization of the United Nations). 1988; p.45.
7. Cohen H, Lapointe M, Fremy JM. Determination of aflatoxin M_1 in milk by liquid chromatography with fluorescence detection. *J Assoc Anal Chem*. 1984;67:49-51.
8. Cortes-Rocha MO, Ramírez-Astudillo WR, Sánchez-Mariñez RI, Rosas-Burgos EC, Wong-Corral FJ, Borboa-Flores J, et al.. Fumonisins and fungal species in corn from Sonora Mexico. *Bull Environ Contam Toxicol*. 2003;70: 668-673.
9. Diaz GJ, Espitia E. Occurrence of aflatoxin M_1 in retail milk samples from Bogota, Colombia. *Food Addit Contam*. 2006;23(8): 811-5.
10. EC reg N466/01 *Official Journal of the European Communities* L313:30 November 2001.
11. Elgerbi AM, Aidoo KE, Candlish AA, Tester RF. Occurrence of aflatoxin M_1 in randomly selected north African milk and cheese. *Food Addit Contam.* 2004;21(6): 592-7.
12. FAO. Inocuidad y calidad de los alimentos en relación con la agricultura orgánica. 22ª Conferencia Regional de da FAO para Europa. Oporto, Portugal, 24-28 de julio de 2000.
13. Gallo P, Salzillo A, Rossini C, Urbani V, Serpe L. Aflatoxin M_1 determination in milk: Method validation and contamination levels in samples from southern Italy. Ital. *J Food Sci*. 2006;3(18):251-259.
14. Galvano F, Galofaro V, Ritieni A, Bognanno M, De Angelis A, Galvano G. Survey of the occurrence of aflatoxin M_1 in dairy products marketed in Italy: Second year of observation. *Food Addit Contam*. 2001;18: 644.

15. Garcia S, Heredia Norma. Mycotoxins in Mexico: Epidemiology, management, and control strategies. *Mycopathology.* 2006;162: 255-264.

16. Garrido NS, Iha MH, Santos Ortolani MR, Duarte F. Ocurrence of aflatoxins M_1 and M2 in milk commercialized in Ribeirao Preto SP Brazil. *Food Addit Contam*. 2003;20(1): 70-3.

17. Ghidini S, Zanardi E, Battaglia A, Varisco G, Ferretti E, Campanini G, et al. Comparison of contaminant and residue levels in organic and conventional milk and meat products from northern Italy. *Food Addit Contam.* 2005;22(1):9-14.

18. Gudynas E. Producción orgánica en América Latina, crecimiento sostenido con énfasis exportador. 2003. En: Observatorio del Desarrollo. CLAES Centro Latino Americano de Ecología Social www.ambiental.met

19. IARC (International Agency for Research on Cancer). Naturally occurring aflatoxins (Group1), aflatoxin M_1 (Group 2B) 08/21/1997. Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Some Naturally Occurring Substances: Food Tems and Constituents, Heterocyclic Aromatic Amines and Mycotoxins. Vol. 56 (Lyon: IARC), 5.1-5.5.

20. IFOAM. Statistics Central y Eastern Europe; http://www.ifoam.de/statistics/statistics_ cee.htm. 2000.

21. ITC. Product and Market Development. Organic Food and Beverages. World Supply and Major European Markets. Geneva. 1999.

22. Kim E, Shon DH, Ryu D, Park JW, Hwang HJ, Kim YB. Occurrence of aflatoxin M_1 in Korean dairy products determined by ELISA and HPLC. *Food Addit Contam*. 2000;17:59-64.

23. López J, Carvajal M, Ituarte B. Supervising programme of aflatoxin in Mexica corn. *Food Addit Contam*. 1995;12(3):297-312.

24. López C, Ramos L, Ramadán S, Bulacio L, Perez J. Distribution of aflatoxin M_1 in cheese obtained from milk artificially contaminated. *Int J Food Microbiol*. 2001;64: 211.

25. Malmauret L, Parent-Massin D, Hardy JL, Verger P. Contaminants in organic and conventional foodstuffs in France. *Food Addit Contam*. 2002;19:524-532.

26. Manetta AC, Di Giuseppe L, Giammarco M, Fusaro I, Simonella A, Gramenzi A, et al. High-performance liquid chromatography with post-column derivatisation and fluorescence detection for sensitive determination of aflatoxin M_1 in milk and cheese. *J Chromato*gr A. 2005;1083(1-2): 219

27. Martins ML, Martins HM. Aflatoxin M_1 in yoghurts in Portugal. *Int J Food Microbiol.* 2004;91(3):315-7.

28. Nakajima M, Tabata S, Akivama H, Itoh Y, Tanaka T, Sunagawa H, et al. Ocurrence of aflatoxin M_1 in domestic milk in Japan during the winter season *Food Addit Contam*. 2004;21(5): 472-8.

29. Norma Mexicana NMX-F-718-COFOCALEC-2006. Sistema producto leche- Producto leche-Alimentos- Lácteos- Guía para el muestreo de leche y productos lácteos. México. P. 31.

30. Offiah N, Adesiyun A. Occurrence of aflatoxins in peanuts, milk, and animal feed in Trinidad. *J Food Prot*. 2007;70(3):771-5.

31. Oliveira CA, Rosmaninho J, Rosim R. Aflatoxin M_1 and cyclopiazonic acid in fluid milk traded in Sao Paulo, Brazil. *Food Addit Contam*. 2006;23(2):196-201.

32. Palermo D, Palermo C, Rotunno T. Survey of aflatoxin M_1 level in cow milk from Puglia Italy. *Ital J Food Sci*. 2001;4(13):435-442.

33. Panariti E. Seasonal variations of aflatoxina M_1 in the farm milk in Albania. *Arh Hig Rada Toksikol.* 2001;52(1):37-41.

34. Quattrocchi OA, Abelaira Sara I, Felipe R. Validación de métodos En: Introducción a la HPLC. Aplicación y Práctica. Ed Artes Gráficas Farro SA. Buenos Aires, Cáp. 12. Pág. 301-328. 1992.

35. Rodriguez Velazco ML, Calonge Delso MM, Ordónez E. ELISA and HPLC determination of the occurrence of aflatoxin M_1 in cow's raw milk. *Food Addit Contam*. 2003;20(3):276-280.

36. Roussi V, Govaris A, Varagouili A, Botsoglou NA. Occurrrence of aflatoxin M_1 in raw milk market milk commercialized in Greece. *Food Addit Contam*. 2002;19:863-868.

37. Sassahara M, Pontes Netto D, Yanaka EK. Aflatoxin occurrence in foodstuff supplied to dairy cattle and aflatoxin M_1 in raw milk in the north of Parana state. *Food Chem Toxicol*. 2005;43(6):981-4.

38. Scott P. Mycotoxigenic fungal contaminants of cheese and other dairy products. Mycotoxins in Dairy Products. Edited by H.P. van Egmond (New York: Elsevier). Pp. 193-259. 1989.

39. SIAP. Análisis Agropecuario Productos Orgánicos. www.siap.sagarpa.gob.mx/InfOMer/analisis/organico.html consultado julio/2007.

40. Tajkarimi M, Shojaee Aliabadi F, Salah Nejad M, Pursoltani H, Motallebi AA, Mahdavi H. Seasonal study of aflatoxin M_1 contamination in milk in five regions in Iran. *Int J Food Microbiol*. 2007;116(3): 346-9.

41. Torres Espinosa E, Acuña AK, Torres NLR, Montoya OR, Castrellón SAJP. Quantification of aflatoxin in corn distributed in the city of Monterrey, Mexico. *Food Addit Contam.* 1995;12(3): 383-386.

42. US Food and Drug Administration (FDA). Sec. 527.400 whole milk, low fat skim milk-aflatoxin M_1 (CPG 7106.210). FDA Compliance Policy Guides (Washington D.C.: FDA). p. 219. 1996.

43. Valeeva NI, Meuwissen PM, Oude-Lansink AGJM, Huirne RBM. Improving food safety within the Dairy Chain: An Application of conjoint analysis. *J Dairy Sci.* 2005;88:1601-1612.

44. Vallone L, Boscariol D, Dragoni I. Aflatoxins in Organic Milk and Dairy Products. *Vet Res Communications.* 2006;30 (Suppl 1): 369-370.

45. Vega S, Coronado M, Gutiérrez R, Díaz G, Salas J, Pérez J, et al. Calidad e inocuidad de alimentos orgánicos y la contaminación ambiental. Industria Alimentaria. 2007;29(3): 10-17.

46. Woese K, Lange D, Boess C, Bögl KW. A comparison of organically and conventionally grown foods - results of a review of the relevant literature. *J Sci Food Agric*. 1997;74: 281-293.

47. Zamorano J. Evolución y perspectivas de la agricultura orgánica en México. En: Claridades Agropecuarias. 2005;140: 3-19.

48. Zinedine A, Gonzalez-Osnaya L, Soriano JM, Molto JC, Idrissi L, Manes J. (2007): Presence of aflatoxin M_1 in pasteurized milk from Morocco. *Int J Food Microbiol*. 2007;28; 114(1): 25-9.

15.8. ANÁLISIS DE LOS COMPUESTOS VOLÁTILES DEL TOMATE DE ÁRBOL (Cyphomandra betacea Sendtn.) MEDIANTE MICROEXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA

Clara E. Quijano[1] y Jorge A. Pino[2]*

[1]Universidad de los Andes, Facultad de Ciencias Departamento de Química. Cra. 1ª Este No. 18- A-10- (Q-826), Bogotá, Colombia E-mail: cquijano@uniandes.edu.co

[2]Instituto de Investigaciones para la Industria Alimenticia, Carretera al Guatao km 3 ½, C.P. 19 200, La Habana, Cuba

Fuente: *Ciencia y Tecnología de Alimentos Vol. 16, No. 3, 2006*

RESUMEN

Los compuestos volátiles del tomate de árbol (Cyphomandra betacea Sendtn.) fueron aislados por microextracción en fase sólida del espacio de cabeza y analizados por cromatografía de gases-espectrometría de masas. Entre los 84 compuestos identificados, 55 se reportan por primera vez. El hexanoato de metilo y 1,8-cineol aparecen como los constituyentes volátiles mayoritarios del tomate de árbol. ***Palabras clave****: tomate de árbol, Cyphomandra betacea, Solanaceae, compuestos volátiles, HS-SPME, GC-MS.*

INTRODUCCIÓN

El tomate de árbol (*Cyphomandra betacea* Sendtn.) es una especie, que pertenece a la familia *Solanaceae*, nativa de Perú y que crece en varias regiones tropicales y subtropicales en el mundo (*1*). En Colombia, esta planta se cultiva en varias regiones y se considera un producto promisorio exportable.

El tomate de árbol es un arbusto, que puede alcanzar hasta los 5 m de altura. Sus frutos son bayas ovaladas y alargadas (de unos 10 cm de largo y 5 cm de ancho); cuando jóvenes son de color verde claro y oscuro y al madurar se tornan anaranjado o rojo oscuro con cáscara lisa y brillante. En su interior, tiene numerosas semillas pequeñas, circulares y planas rodeadas por un gel de color púrpura con alto contenido de antocianinas; las semillas se encuentran reunidas en el centro de la pulpa de color amarillo. Esta pulpa es jugosa, de olor agradable y sabor dulce, astringente y ligeramente ácida. Generalmente se consume como dulce y en jugo (*2*,*3*).

Los compuestos volátiles asociados al aroma del tomate de árbol han sido analizados con el uso de distintas técnicas que incluyen la destilación-extracción con disolvente simultáneas (*4*), extracción líquida-líquida (*5*), extracción con CO_2 supercrítico (*6*), así como destilación a presión reducida (*7*) y como resultado se han identificado 84 compuestos en concentraciones muy variables, probablemente debido a los distintos procedimientos usados para su aislamiento.

La microextracción en fase sólida del espacio de cabeza (HS-SPME) es una técnica de aislamiento de compuestos volátiles sencilla, rápida, que no emplea

disolvente y con costos relativamente bajos, que se ha utilizado en el estudio del aroma de diversas frutas (*8*).

El presente trabajo tuvo como objetivo el análisis de los compuestos volátiles del tomate de árbol (*Cyphomandra betacea* Sendtn., var. roja) mediante HS-SPME y GC-MS.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para el estudio se utilizaron frutas maduras recolectadas en Caquetá, Colombia y transportadas por aire al laboratorio antes de las 24 h de cosechadas.

El equipamiento para la SPME fue de Supelco Inc. (Bellefonte, EE.UU.). Se utilizaron 3 fibras diferentes: polidimetilsiloxano 100 µm (PDMS), polidimetilsiloxano-divinilbenceno 65 µm (PDMS/DVB) y carboxenpolidimetilsiloxano 75 µm (CAR/PDMS). Las fibras fueron activadas de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Se realizaron pruebas preliminares con la fibra de PDMS para establecer las condiciones experimentales para HS-SPME de los compuestos volátiles del tomate de árbol, particularmente la temperatura y tiempo de extracción. Para cada extracción, se mezclaron 50 g de pulpa de fruta sin semillas y 50 mL de una solución de NaCl al 20 % en una licuadora Braun MR 400 por 10 min y posteriormente se centrifugó a 3 000 rev/min durante 10 min. Una cantidad de 7 g del sobrenadante fue inmediatamente colocada en un vial de 15 mL. En cada extracción, la muestra se mantuvo por 15 min para alcanzar el equilibrio térmico y después, la fibra se expuso en el espacio de cabeza de la muestra durante 30 min. La muestra fue mantenida en agitación a rev/min a 40ºC. La desorción se realizó por 2 min en el inyector del cromatógrafo de gases a 250ºC para las fibras de PDMS y PDMS/DVB, y a 300 ºC para la fibra de CAR/PDMS.

El análisis por cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC-MS) se realizó en un equipo HP 6890 Serie II acoplado a un detector de masas HP-5973N y a una columna de cuarzo HP-5MS (30 m x 0,25 mm d.i. x 0,25 µm). El programa de temperatura usado fue: 2 min isotérmico a 50ºC y rampa hasta 220ºC a 4ºC/min. El gas portador utilizado fue helio a 1 mL/min. La temperatura del inyector, interfase y detector fue de 230ºC. Se inyectó en modo *splitless* (2 min). Los espectros de masas se midieron a 70 eV. Se calcularon los índices de retención cromatográficos a partir de una mezcla de n-alcanos de C8-C25.

Los compuestos fueron identificados por comparación de sus espectros de masas con los reportados en las bases NIST/EPA/NIH y FLAVORLIB (obtenida con registros de sustancias patrones) y confirmados en muchos casos por comparación de sus índices de retención (IK) con los de sustancias patrones.

Las determinaciones cuantitativas se hicieron por el método de normalización interna de análisis por duplicado y se expresaron como porcentajes de áreas en el cromatograma.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el análisis de compuestos volátiles mediante HS-SPME, hay que tener en cuenta su estructura y volatilidad, la selectividad de la fibra, así como otros parámetros tales como: la temperatura, tiempo de extracción, agitación, adición o no de alguna sal y condiciones de desorción. La polaridad de la fibra condiciona la selectividad del aislamiento, por lo que debe elegirse la fibra atendiendo a las características de los compuestos a analizar.

Para establecer las mejores condiciones para aislar los compuestos volátiles del tomate de árbol se ensayaron tres fibras disponibles.

Los resultados con la fibra de PDMS/DVB fueron mejores, debido al mayor número y concentración de compuestos volátiles. Por tal razón, se seleccionó esta para analizar los componentes volátiles del tomate de árbol. Debido a que en el presente trabajo solo es de interés el estudio cualitativo, no se evaluaron los parámetros experimentales que pudieran influenciar en los resultados cuantitativos. Con los parámetros seleccionados se obtuvieron cromatogramas reproducibles con muy pequeña variación de las áreas de picos. Es interesante señalar, que debido a la presencia de algún disolvente en los otros trabajos reportados (*4-7*) fue imposible detectar compuestos muy volátiles, *e.g.* acetaldehído, a diferencia de lo que ocurre cuando se emplea la HS-SPME.

En total se identificaron 84 compuestos volátiles, 56 de los cuales se informan por primera vez en esta fruta (tabla 1).

De acuerdo a las clases químicas presentes, los ésteres dominan el perfil de volátiles. Estos componentes (50,7 % del total de la composición) incluyen numerosos ésteres metílicos. De ellos, el hexanoato de metilo y butanoato de metilo, junto con el butanoato de etilo son los mayoritarios. Los estudios anteriores (*4,5,7*) también reportaron concentraciones elevadas de ésteres. La γ-butirolactona, no reportada anteriormente, fue la única lactona identificada; mientras que a diferencia de un reporte previo (*5*), no se encontraron hidroxiésteres.

En el grupo de terpenoides (27,2 % del total de la composición), varios hidrocarburos y derivados oxigenados fueron identificados, todos monoterpenoides. De ellos, el 1,8-cineol y α-terpineol fueron los de mayor concentración. Los estudios anteriores no habían reportado concentraciones altas de 1,8-cineol (*4-7*).

Los compuestos carbonílicos y alcoholes constituyeron 4,7 y 5,2 % del total de los compuestos volátiles aislados, donde sobresalen el decanal y el 2-metil-2-dodecanol, este último no informado anteriormente. Otras clases presentes fueron los ácidos (9,6 %) y fenoles (0,2 %).

Las discrepancias observadas con trabajos anteriores pueden atribuirse no solo a la técnica de aislamiento, sino al origen de las frutas y al estado de madurez.

El aroma del tomate de árbol rojo ha sido descrito como frutal, herbal, con notas

a madera y especiadas, y con un olor que recuerda al del tomate (*3*). Ciertamente, muchos de los compuestos identificados pudieran contribuir al aroma de esta fruta, particularmente los ésteres, con su bajo umbral de detección (*9*) pudieran aportar las notas frutales, mientras que el eugenol y metil eugenol pueden ser responsables de la nota especiada y el 1,8-cineol de la nota herbácea (*10*). Muchos de los ésteres identificados en el tomate de árbol han sido reportados en otras frutas tropicales y subtropicales; ésteres metílicos similares a los encontrados en el presente trabajo han sido señalados como importantes contribuyentes del aroma de las frutas tropicales (*3*).

Tabla 1. Compuestos volátiles identificados en el tomate de árbol

Compuesto	Identificacion[a]	IK	%
acetaldehido*	A	435	0,2
ácido acetico	A	610	0,4
butanoato de metilo	A	729	2,7
hexanal	A	802	t
butanoato de etilo	A	804	2,4
pentanoato de metilo	A	828	0,1
butanoato de isopropilo*	A	845	0,1
2E-hexenal	A	855	0,5
3Z-hexenol	A	859	0,3
m-xileno*	A	870	t
acetato de 3-metil-3-butenilo*	C	885	0,1
γ-butirolactona	A	915	1,8
hexanoato de metilo	A	927	36
α-tuyeno*	B	930	t
benzaldehido*	A	960	t
sabineno	B	975	0,1
β-pineno*	A	979	0,1
dehidro-1,8-cineol*	B	991	0,6
hexanoato de etilo	A	998	0,3
octanal*	A	999	0,4
acetato de 3Z-hexenilo*	A	1005	0,3
α-terpineno*	B	1017	0,3
p-cimeno*	A	1025	0,2
heptanoato de metilo*	A	1026	0,1
limoneno	A	1029	0,4
1,8-cineol	A	1031	16,4
(Z)-β-ocimeno	B	1037	t
γ-terpineno	A	1060	0,7
dihidromircenol*	B	1074	0,1
terpinoleno	B	1089	0,1
p-cimeneno*	B	1091	0,3
benzoato de metilo	A	1092	0,6
linalol	A	1097	0,6

Compuesto	Identificacion[a]	IK	%
nonanal*	A	1101	0,7
cis-oxido de rosa*	B	1108	0,3
octanoato de metilo*	A	1127	1,8
alcanfor*	A	1146	0,1
2E,6Z-nonadienal*	A	1155	0,1
p-menta-1,5-dien-8-ol	B	1170	0,2
terpinen-4-ol	A	1177	0,7
ácido octanoico*	A	1180	0,1
butanoato de 3Z-hexenilo	B	1186	0,9
α-terpineol	A	1189	3,1
salicilato de metilo	A	1192	0,3
γ-terpineol*	B	1199	0,3
decanal*	A	1202	1,1
2-fenoxietanol*	B	1228	0,5
neral*	A	1238	0,1
carvona*	A	1243	t
geraniol	A	1253	0,3
geranial	A	1267	0,1
ácido nonanoico*	A	1271	0,3
acetato de 1,1-dimetilfenetilo*	C	1306	0,2
acetato de α-terpinilo*	B	1349	0,1
acetato de citronelilo*	B	1353	0,5
eugenol	A	1359	0,1
ácido decanoico*	A	1371	0,3
cuminato de metilo*	B	1375	0,7
acetato de geranilo*	A	1381	0,3
metil eugenol*	A	1404	0,1
dodecanal*	A	1409	0,6
2-metil-2-dodecanol*	C	1423	4,4
cumarina*	C	1434	0,1
geranilacetona	B	1455	0,6
α-isometilionona*	C	1480	1
(E)-β-ionona*	B	1489	0,3
butanoato de 1,1- dimetilfenetilo*	C	1492	0,4
2-tridecanona*	B	1496	0,1
salicilato de isopentilo*	B	1537	0,4
ácido dodecanoico*	A	1571	1,4
salicilato de pentilo*	C	1585	0,2
tetradecanal*	A	1613	0,4
benzofenona*	A	1628	T
leptospermona*	B	1631	1,2
cis-dihidrojasmonato de metilo*	B	1656	0,7
ácido tridecanoico	A	1672	0,6
2-pentadecanona*	A	1696	0,4

Compuesto	Identificacion[a]	IK	%
2-hexil-(E)-cinamaldehido*	B	1750	0,7
ácido tetradecanoico*	A	1771	0,9
tetradecanoato de isopropilo*	C	1830	0,9
ácido pentadecanoico*	A	1871	0,7
ácido 9Z-hexadecenoico*	A	1953	0,9
ácido hexadecanoico*	A	1971	4,1

t Indica menos de 0,1 % en el cromatograma.
* Identificado por primera vez en esta fruta.
[a] La identificación según: A, coincidencia de espectro de masas e IK con sustancias patrones; B, coincidencia de espectro de masas e IK con literatura; C, coincidencia de espectro de masas con literatura.

CONCLUSIONES

El estudio de los compuestos volátiles del tomate de árbol (*Cyphomandra betacea* Sendtn., var. roja) mediante microextracción en fase sólida del espacio de cabeza y cromatografía de gases-espectrometría de masas arrojó la identificación de 84 compuestos, de los cuales 55 se reportan por primera vez. El hexanoato de metilo y 1,8-cineol aparecen como los constituyentes volátiles mayoritarios del tomate de árbol.

REFERENCIAS

1. Wrolstad, R. E. y Heatherbell, D. A. J. Sci. Food Agric. 25: 1221-1228, 1974.
2. Bartholomäus, A.; De la Rosa, A.; Santos, J. O.; Acero, L. E. y Moosbrugger, W. El Manto de la Tierra-Flora de los Andes. Bogotá, Ediciones Lerner, 1990, p. 165.
3. Duque, C. y Morales, A. L. El aroma frutal de Colombia, Bogotá, Universidad Nacional de Colombia, 2005, p. 77.
4. Boada, M. N. Determinación de los componentes volátiles mayoritarios del tomate de árbol (*Cyphomandra betacea*) a pH natural y a pH 7 (Trabajo de grado. Química, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá) 1992.
5. Torrado, A.; Suárez, M.; Duque, C.; Krajewski, D.; Neugebauer, W. y Schreier, P. Flav. Fragr. J. 10: 349-354, 1995.
6. Hernández, M. R. y Villalobos, N. J. Uso de algunos agentes de retención para la protección del aroma del tomate de árbol (*Cyphomandra betacea*) extraído con CO_2 supercrítico (Trabajo de grado. Universidad Nacional de Colombia, Bogotá) 1995.
7. Wong, K. C. y Wong, S. N. J. Essent. Oil Res. 9: 357-359, 1997.
8. Pawliszyn, J. Quantitative aspects of SPME, en Applications of solid phase microextraction. Pawliszyn J. (ed.), Canada, Royal Society of Chemistry, 1999.
9. Van Gemert, L. J. y Nettenbreijer, A. H. Compilation of odor threshold values in air and water. Zeist, Netherlands, CIVOTNO, 1977.
10. Arctander, S. Perfume and flavor chemicals. Copenhagen, Det Hoffensbersgke Etablissement, 1969.

15.9. MÉTODO DE MICROEXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA PARA EL ANÁLISIS DE COMPUESTOS VOLÁTILES EN CERVEZAS

Isabel Thorndike y Jorge A. Pino*

Instituto de Investigaciones para la Industria Alimentaria. Carretera al Guatao, km 3 ½, La Habana, Cuba, C.P. 19200.

Fuente: *Ciencia y Tecnología de Alimentos Vol. 20, No. 1, 2010*

RESUMEN

Se desarrolló un método por microextracción en fase sólida para la determinación de compuestos volátiles en cerveza mediante cromatografía de gases-espectrometría de masas. Se evaluaron tres fibras comerciales comúnmente empleadas en cerveza: PDMS, PDMS/DVB y CAR/PDMS, cuatro concentraciones de cloruro de sodio (0; 12,5; 25 y 37,5 % m/ v), tres tiempos de pre-extracción (5, 10 y 15 min). Para la optimización del tiempo y temperatura de extracción se utilizó un diseño de superficie de respuesta. Los valores optimizados fueron fibra de CAR-PDMS (85 m), adición de 2 g de cloruro de sodio a 8 mL de muestra, 10 min de preextración, extracción a 35 ºC por 30 min y 2 min de deserción.

Palabras clave*: cerveza, SPME, compuestos volátiles.*

INTRODUCCIÓN

En la cerveza existen diferentes compuestos volátiles que caracterizan o le confieren determinadas características aromáticas deseadas o no deseadas al producto final (*1*). La escasa concentración e inestabilidad de muchos de estos compuestos dificulta la obtención de un concentrado a partir del alimento, que sea representativo del aroma original y que esté libre de contaminantes u otras sustancias producidas durante el aislamiento. De ahí que se han desarrollado técnicas especiales para su aislamiento y concentración, generalmente basados en la destilación a vacío, técnicas del espacio de cabeza, extracción con disolventes (*2, 3*).

El desarrollo de métodos analíticos más sensibles y selectivos se encamina a detectar componentes en los alimentos. El desarrollo de la técnica de microextracción en fase sólida (SPME por sus siglas en inglés) ha sido el mayor avance en el área de los análisis de los microcomponentes orgánicos volátiles realizados en la última década, principalmente cuando se analiza el progreso del análisis instrumental y la cuantificación de las muestras concentradas (*4*). Dentro de las principales ventajas que presenta este método se encuentran su simplicidad operacional, el poco tiempo de manipulación de la muestra, lo cual permite eliminar los errores de este tipo, presenta gran sensibilidad, pues para la determinación existen parámetros específicos, así como su rapidez a la hora de ejecutar la determinación (*2*).

Por tanto el objetivo de este trabajo fue optimizar un método por SPME para la determinación de compuestos volátiles en cerveza.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para la estandarización del método se utilizaron fibras para SPME, viales de 15 mL con rosca y membrana de silicona/PTFE y un porta-fibra manual (holder), todos comercializados por Supelco (Bellefonte, EE.UU.). La extracción de los compuestos volátiles mediante HS-SPME fue realizada evaluando cada una de las condiciones en un baño de agua termostatado, con agitación magnética. Posteriormente la fibra fue retirada del vial e insertada en el puerto de inyección del cromatógrafo de gases.

Las condiciones iniciales se prefijaron de acuerdo a los reportes encontrados y las experiencias del laboratorio (5-7). Los viales fueron herméticamente cerrados con una membrana de silicona. Al inicio del análisis fueron prefijadas algunas condiciones: 2 g de cloruro de sodio, 8 mL de cerveza, 15 min de extracción a 35ºC, agitación a 100 min-1 y tiempo de desorción de 2 min. Posteriormente se realizó la extracción de los volátiles en muestras de cerveza Bucanero, con las condiciones prefijadas de HS-SPME y se identificaron los componentes de la fracción volátil de la cerveza por cromatografía de gases acoplada a GC-MS.

Se evaluó la capacidad de extracción de tres fibras comerciales reportadas como las más utilizadas en la extracción de compuestos volátiles (PDMS 100 ì m; CAR/PDMS 85 ì m y PDMS/DVB 65 ì m).

Se estudiaron tres tiempos de pre-extracción según reportes encontrados, (5, 10 y 15 min), (*2*). La cantidad utilizada de cerveza se estableció en función de lograr el mínimo volumen del espacio de cabeza con relación a la muestra, pero conservando la altura del espacio de cabeza que permitiese la exposición de la fibra a los volátiles, sin contacto directo con la muestra. Por esta razón, dado que los viales utilizados fueron de 15 mL, se adicionaron 8 mL de cerveza previamente filtrada para desgasificar la muestra. Además se evaluó el tiempo de desorción de los volátiles retenidos por la fibra de PDMS (2 y 4 min) en el puerto de inyección del cromatógrafo de gases, configurado en modo *splitless*.

La extracción de los compuestos volátiles se hizo a tres temperaturas controladas y tres tiempos de extracción, mediante un diseño de superficie de respuesta con un modelo factorial de tres niveles. Períodos de tiempo de 10, 15 y 20 min fueron evaluados a temperaturas de 20, 30 y 40ºC.

El análisis se realizó en un cromatógrafo de gases con detector de ionización por llama de hidrógeno Konik 4000A HRGC con una columna DB-5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 mm) J & W Scientific, Products GMBH Köln). La temperatura del inyector fue de 250 ºC para las fibras de PDMS, PDMS/DVB y CW/DVB, así como 280 ºC para la fibra de CAR/PDMS según las temperaturas recomendadas por el fabricante (Supelco, Bellefonte, EE.UU.). Se utilizó un inserto de 0,75 mm en el inyector del equipo para favorecer la desorción rápida de los analitos. La temperatura del detector fue de 250 ºC. El horno se programó desde 50 ºC por 2 min e incremento hasta 250 ºC a 4 ºC/min y sostenido por 8 min. El gas portador empleado fue hidrógeno con un flujo de 1 mL/min. Los índices de

retención cromatográficos de los compuestos volátiles se calcularon a partir de una serie homóloga de n-parafinas (C8-C24).

En el trabajo experimental se utilizó un equipo Shimadzu GCMS QP-5000 (Tokio) con una columna XTI-5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 ì m) (Restek, EE.UU.). El horno se programó de forma similar a GC-FID. Las temperaturas del inyector y la interfase fueron 280 y 250 ºC, respectivamente. El gas portador fue helio con un flujo de 1 mL/min. Los parámetros de adquisición del detector de masas fueron por ionización electrónica a 70 eV y con un rango de m/z de 35 a 45 Dalton.

Se aplicó la estadística descriptiva que incluyó el valor promedio y desviación estándar. Se aplicó la prueba de Bartlett para comprobar la homogeneidad de varianza en todos los casos. La diferencia entre los valores promedios de las variables dependientes se examinó mediante análisis de varianza de clasificación simple. En caso de existir diferencias significativas se aplicó la prueba de rangos múltiples de Duncan (*8*). Para el procesamiento se usó el programa Statistica ver. 6 (StatSoft Inc., Tulsa, EE.UU.).

La optimización de la temperatura y tiempo de extracción de la HS-SPME se realizó mediante las técnicas de superficie de respuesta. Estas técnicas son una combinación de análisis de regresión y diseño experimental para proporcionar medios económicos de localizar un conjunto de condiciones experimentales, o sea una combinación de niveles de factor que proporcionen una respuesta máxima o mínima. Estas técnicas poseen un rasgo muy distintivo a diferencia de otras técnicas estadísticas y es su naturaleza secuencial, lo que las hace apropiadas para la mayoría de las investigaciones que son de tipo continuo (y por consiguiente secuencial).

Se utilizó un modelo de diseño factorial de tres niveles (modelo 32), lo que equivale a dos factores con tres niveles. Los factores fueron la temperatura y tiempo de extracción, mientras que las variables de respuesta fueron el área total del cromatograma y el número total de picos cromatográficos detectados (siempre que no fueran contaminantes o posible producto de degradación de la fibra). Los datos experimentales de área total se transformaron a su valor logarítmico para garantizar la suposición de aditividad en el análisis de varianzas (*8*).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La eficiencia de la extracción de los componentes volátiles depende, en gran medida, del tipo de fibra a utilizar (*4*). Se utilizó la técnica HS-SPME debido a que es una técnica simple y de bajo costo. Dentro de la misma se seleccionó la variante de espacio de cabeza para evitar la contaminación de la fibra con la muestra de cerveza.

La figura 1 presenta los resultados de la comparación de las fibras con distintos tiempos de deserción. El procesamiento estadístico de los datos de área total de los diferentes experimentos indicó que fueron significativos la fibra, el tiempo y su interacción para $p \leq 0,05$, lo que indica que el área total no se comportó igual

para cada tiempo y fibra. Con la fibra de CAR-PDMS y 2 min de desorción se logró la mayor área total. Este resultado concuerda con los reportados por otros autores (*9,10*). Sin embargo, otros estudios informan que la fibra de PDMS es más selectiva para el análisis de cervezas (*7*).

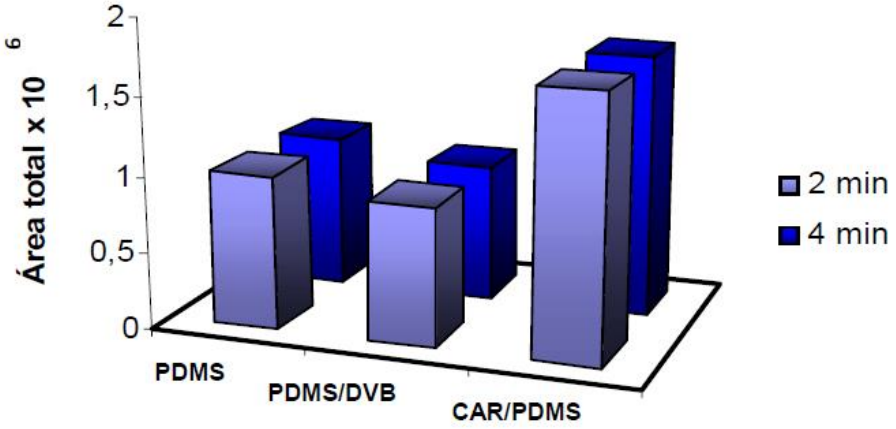


Figura 1. Comparación de las fibras con distintos tiempos de deserción

No se encontraron diferencias significativas en las variables de respuesta área total y número de picos cromatográficos para los dos tiempos de desorción evaluados con las fibras de CAR/PDMS, PDMS y PDMS/DVB. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos se seleccionó la fibra de CAR/PDMS y tiempo de desorción de 2 min para continuar el estudio de optimización al lograr en la extracción un máximo en las dos variables de respuesta.

Para estudiar este efecto se realizaron experiencias con diferentes concentraciones de cloruro de sodio (0; 12,5; 25 y 37,5 % m/v), las que corresponden a la adición de 0, 1, 2 y 3 g de sal común a los 8 mL de cerveza. Sin la adición de cloruro de sodio solo se apreciaron 15 picos cromatográficos; mientras que la adición de la sal, independientemente de la concentración, arrojó la presencia de 20, 25 y 24 picos con el gradiente de concentración. La adición en la cerveza de 25 y 37,5 % en peso de cloruro de sodio logró un máximo en la eficiencia de la extracción para $p \leq 0,05$.

La figura 2 muestra los resultados del análisis estadístico, en el cual se obtuvieron las mayores áreas totales para las concentraciones de cloruro de sodio de 25 y 37,5 % y estas no se diferenciaron entre sí. Por tanto, se seleccionó la concentración de cloruro de sodio de 25 % m/v para continuar las experiencias.

Otro de los parámetros estudiados fue el tiempo de preextracción debido a su relación directa con la eficiencia del método de SPME. Para ello se evaluaron tres tiempos: 5, 10 y 15 min. Los resultados indicaron que con los tiempos de 10 y 15 min se logró un mayor número de picos con respecto a 5 min.

La figura 3 refleja el cálculo del área total. Al comparar estadísticamente los valores de áreas totales para 10 y 15 min de pre-extracción no se encontraron

diferencias significativas para p≤0,05. Por tal razón, se seleccionaron 10 min para continuar la optimización.

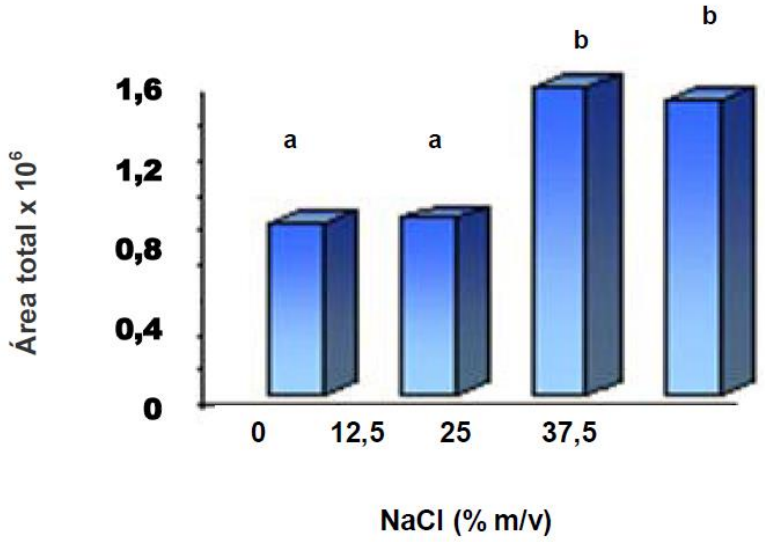


Figura 2. Influencia de la concentración salina en el área total de los picos. Fibra CAR/PDMS, 8 mL de cerveza, 15 min de pre-extracción y 2 min de desorción.Letras distintas indican diferencias significativas para p≤0,05.

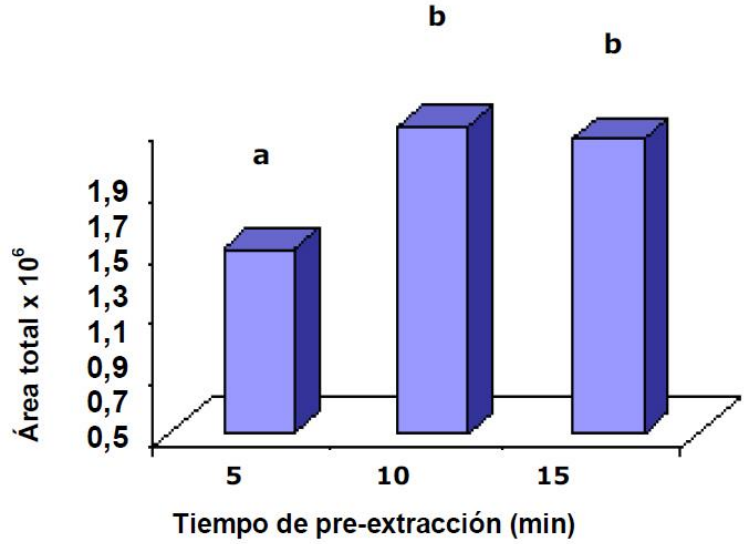


Figura 3. Influencia del tiempo de pre-extracción en el área total. Fibra CAR/PDMS, 8 mL de cerveza, 2 g de NaCl y 2 min de desorción. Letras distintas indican diferencias significativas para p≤0,05.

La selección de las variables que afectan el desarrollo de métodos por HS-SPME se ha realizado sobre la base de no tener en cuenta sus interacciones, suponiendo que existe independencia entre los factores o variables que intervienen en los análisis. La interacción es la respuesta diferencial a un factor en combinación con niveles variables de un segundo factor aplicado simultáneamente, es decir, es un efecto adicional debido a la influencia combinada de dos o más factores.

El tiempo y la temperatura de extracción son dos de los factores más importantes que afectan la presión de vapor y el equilibrio del sistema. Como consecuencia la repetitividad y la reproducibilidad de los compuestos volátiles en el espacio de cabeza, serán grandemente afectadas si existen cambios en la presión de vapor. Por tanto, para lograr un buen desempeño del método se optimizaron estos dos parámetros. Para el estudio se seleccionó un diseño de superficie de respuesta con un modelo factorial de tres niveles para dos factores: temperatura y tiempo, en el que se emplearon como variables de respuesta el área total de los picos expresado como su logaritmo y el número de picos cromatográficos

A partir del logaritmo de las áreas totales se obtuvo un modelo de regresión múltiple. En el gráfico de contorno, la zona definida por los rangos de temperatura de 30 a 42 ºC y tiempo de 24 a 37 min fue sugerida como la más adecuada para el análisis de los componentes volátiles en cerveza.

La figura 4 refleja que en esta zona se obtuvieron valores superiores a 0,85 (de un máximo posible de 1), para la función objetivo (desirability function). El hecho de que las temperaturas óptimas sean relativamente bajas resulta ventajoso pues mantener la fibra a bajas temperaturas es una condición favorable para el procedimiento de SPME (*4*). El programa arrojó como solución óptima 30,9 min a 37ºC (desirability = 0,983). Teniendo en cuenta facilitar el control de los parámetros de la técnica se decidió seleccionar 30 min a 35 ºC, (desirability = 0,957) para los factores de tiempo y temperatura de extracción.

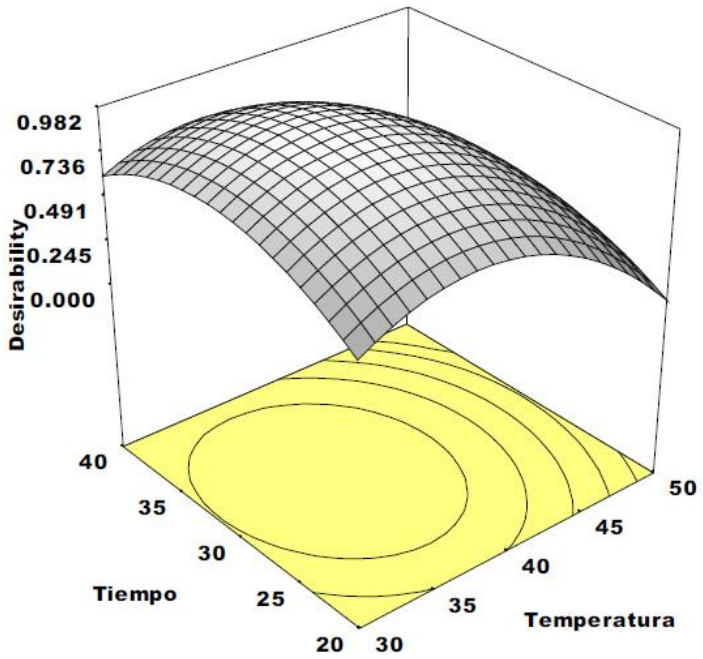


Figura 4. Superficie de respuesta para la optimización del tiempo y temperatura de extracción

CONCLUSIONES

Se optimizó y validó parcialmente un método de HS-SPME para el análisis de compuestos volátiles en cerveza. Los valores optimizados fueron los siguientes: fibra de CAR-PDMS (85 m), adición de 2 g de cloruro de sodio a 8 mL de muestra, tiempo de pre-extración 10 min, 30 min de extracción a 35 ºC y 2 min de desorción.

REFERENCIAS

1. Augusto, F.; Pires, A.; Dos Santos, E. y Revellino, S. J. Chromatogr. A 889, 3-14, 2000.
2. Kataoka, H.; Lord, H. y Pawliszyn, J. J. Chromatogr. A. 880, 35-39, 2000.
3. Beattie, S.; Devine, S. y Kirk, L.L. Food Chem. 86, 234-240, 2004.
4. Pawliszyn, J. Applications of Solid-Phase Microextraction. Royal Society of Chemistry, Cambridge, 1999, pp. 3-21.
5. Christopher, J.; Scarlata, C. y Ebeler, S. J. Agric. Food Chem. 47, 2502-2507, 1999.
6. Smith, R. y Hill, G. J. Chromatogr. A 872, 203-213, 2000.
7. Wardencki, W.; Sowinski, P. y Curyo, J. J. Chromatogr. A 984, 89-96, 2003.
8. Baird, D. Experimentación: Una Introducción a la Teoría de las Mediciones y al Diseño de Experimento, México, D.F, Prentice-Hall Hispanoamericana S.A., 1991.
9. Jelén, H.; Dabrowska, A.; Klensporf, D.; Nawrocki, J. y Wasowiwicz, E. Chem. Anal. (Warsaw) 49, 869-872, 2004.
10. Liu, M.; Zerg, Z. y Xiong, B. Chromatogr. A 1065, 287-299, 2005.

15.10. VALIDACIÓN DE UN MÉTODO POR CROMATOGRAFÍA DE GASES PARA LA DETERMINACIÓN DE LOS ÁCIDOS GRASOS QUE COMPONEN EL D-004 INGREDIENTE ACTIVO

Eduardo A. Rodríguez-Leyes, David Marrero Delange, Víctor L. González Canavaciolo, Roxana Sierra Pérez y Yuliamny Adames Fajardo.

Centro de Productos Naturales, Centro Nacional de Investigaciones Científicas, Calle 198 entre Avenidas 19 y 21, Reparto Atabey, Playa, Apartado Postal 6414,Ciudad de La Habana, Cuba.

Fuente: *Revista CENIC Ciencias Químicas, Vol. 40, No. 1, 2009.*

RESUMEN

El D-004 es un nuevo ingrediente activo obtenido a partir de los frutos de la palma real cubana (Roystonearegia), el cual ha demostrado su efectividad en modelos experimentales de hiperplasia prostática. Esta sustancia está compuesta principalmente por una mezcla de ácidos grasos (AG) saturados e insaturados libres, entre 8 y 18 átomos de carbono. Se desarrolló y validó un método por cromatografía gaseosa para la determinación de los AG en el D-004. Los AG fueron analizados como ésteres metílicos, obtenidos por reacción con cloruro de acetilo al 10 % en metanol y separados en una columna capilar widebore BPX-5 utilizando ácido tridecanoico como patrón interno. En el estudio de especificidad se demostró que no hubo interferencias en la determinación de esta mezcla, una vez que las muestras fueron sometidas a condiciones de estrés. La determinación del contenido de AG totales fue lineal (r > 0,999; CVs de los factores de respuesta y la pendiente menores que 5 y 2 %, respectivamente) y sin sesgo en todo el intervalo estudiado, desde 50 a 150 % de la masa nominal. Se obtuvieron recobrados elevados en el estudio de exactitud (100,4 a 100,8 %), realizado en un intervalo de 80 a 120 % de la concentración nominal. Se obtuvieron buenos resultados en los estudios de repetibilidad y precisión intermedia (CV < 2 %), lo que probó que el método es preciso. Conforme a estos resultados, el procedimiento validado es apropiado para el control de calidad y los estudios de estabilidad de este ingrediente activo.

Palabras clave: *D-004, ácidos grasos, cromatografía gaseosa, validación, Roystonea regia*

INTRODUCCIÓN

La hiperplasia prostática benigna (HPB) es una de las patologías más frecuentes en los hombres con más de 50 años y su frecuencia se incrementa con la edad. Hoy día los medicamentos de primera elección para el tratamiento de la HPB son los inhibidores de la 5-alfa reductasa prostática y los bloqueadores de los receptores alfa1- adrenérgicos de origen sintético.[1] Por otra parte, existen algunas sustancias de origen vegetal como el extracto lipídico de saw palmetto (*Serenoa repens*), que también son ampliamente empleados en el tratamiento de esta patología.[2] Teniendo en cuenta estos antecedentes, queda justificada la búsqueda de medicamentos eficaces, seguros y bien tolerados a partir de fuentes existentes en el país para la terapia y prevención de la HPB, los cuales podrían incrementar la expectativa y la calidad de vida de la población cubana.

El D-004 es un nuevo ingrediente activo que consiste en un extracto lipídico de los frutos de la palma real cubana (*Roystonea regia*), el cual ha demostrado efectividad en modelos experimentales de HPB.[3-5] Esta sustancia está compuesta por una mezcla de ácidos grasos (AG) libres entre 8 y 18 átomos de carbono, siendo los ácidos oleico, láurico, palmítico y mirístico los componentes mayoritarios.

El desarrollo de un nuevo ingrediente activo lleva implícito, entre otros requerimientos químico farmacéuticos, contar con métodos analíticos suficientemente exactos y precisos para su control de la calidad y sus estudios de estabilidad. Actualmente, los AG son analizados principalmente por Cromatografía de Gases (CG) en forma de ésteres metílicos y separados por columnas capilares.[6,7] Teniendo en cuenta que en este tipo de extracto lipídico la actividad farmacológica se le atribuye fundamentalmente a los AG saturados ($C_{12:0}$, $C_{14:0}$),[2-5] en el presente trabajo se decidió desarrollar y validar una metodología para la determinación de los AG que componen el D-004 ingrediente activo por CG empleando una columna apolar, la cual permite la determinación individual de los AG saturados y la conjunta de los AG insaturados con igual número de átomos de carbono. El procedimiento propuesto fue validado siguiendo criterios bien establecidos[8-11] para asegurar su aplicación en el control de la calidad y estudios de estabilidad de dicha sustancia.

MATERIALES Y MÉTODOS

Reactivos y disoluciones

D-004 ingrediente activo (lote 020205) obtenido en el Departamento Química del Centro de Productos Naturales, Centro Nacional de Investigaciones Científicas (Ciudad de La Habana). Patrones de los ácidos decanoico (cáprico, $C_{10:0}$), dodecanoico (láurico, $C_{12:0}$), tetradecanoico (mirístico, $C_{14:0}$), hexadecanoico (palmítico, $C_{16:0}$), 9-octadecenoico (oleico, $C_{18:1}$), octadecanoico (esteárico, $C_{18:0}$), tridecanoico ($C_{13:0}$) y ésteres metílicos de los ácidos octanoico (caprílico, $C_{8:0}$), 9-hexadecenoico (palmitoléico, $C_{16:1}$) y 9-octadecenoico (oleico, $C_{18:1}$).

Disolución metilante (DME) de cloruro de acetilo 10 % en metanol.

Disolución de hidróxido de sodio en agua (NaOH-H_2O) 2 mol/L.

Disolución acuosa de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) 30 %.

Disolución matriz de referencia (DMR). Se pesaron con exactitud de 0,1 mg, alrededor de 10 mg de cada uno de los ácidos siguientes: $C_{10:0}$, $C_{12:0}$, $C_{14:0}$, $C_{16:0}$ y $C_{18:0}$ en un tubo de ensayos y se aplicó la metodología analítica.

Disolución de Referencia de ácidos (DRA). Se pesaron 15,37; 452,61; 188,10; 247,12; 53,38 y 829,00 mg de los ácidos $C_{10:0}$, $C_{12:0}$, $C_{14:0}$, $C_{16:0}$, $C_{18:0}$ y $C_{18:1}$ y se disolvieron en 100 mL de n-hexano.

Disolución de patrón interno (DPI). Se pesó con exactitud de 0,1 mg, alrededor de 1 g de $C_{13:0}$, y se disolvió en 100 mL de metanol.

En el estudio se emplearon patrones de SIGMA (St. Louis, MO, USA); reactivos y disolventes (MERCK, Darmstadt, Alemania) y agua destilada.

Equipos

Cromatógrafo de gases GC 14A (Shimadzu, Japón) con detector de ionización por llama (DILL), acoplado a sistema de cómputo (Konixbert, Barcelona, España), con columna capilar *wide-bore* con fase enlazada BPX-5 (30 m x 0,53 mm d.i. y 1,5 µm de espesor de película, SGE, Australia). Programación: de 120 ºC (2 min) a 320 ºC, a 10 ºC /min . Flujo del gas portador (H_2): 8 mL/min . Temperatura del detector y el inyector: 320 ºC y volumen de inyección: 1 µL en modo *splitless*.

La especificidad del método se comprobó por CG–Espectrometría de Masas (CG-EM). Se utilizó un cromatógrafo de gases 6890N con detector selectivo de masas 5975 B *Inert* acoplado a un sistema de cómputo y con columna capilar HP-5MS (30 m x 0,25 mm d.i., 0,25 µm de espesor de película, Agilent Technologies, CA, USA). Programación: de 70 °C (1 min) a 180 a 20 °C/min, de 180 a 230 °C a 2 °C/min, y de 230 a 320 °C a 20 °C/min . Temperatura del inyector: 300 ºC, y volumen de inyección: 0,5 µL en modo *splitless*. Flujo del gas portador (He): 1 mL /min . Temperaturas de la fuente, la interfase y el cuadrupolo fueron 250, 300 y 150 ºC, respectivamente. La energía de ionización fue 70 eV . El espectro de masas fue adquirido continuamente de 40 a 800 m/z en modo *scan*.

Preparación de la muestra

En un tubo de ensayos se pesaron, con exactitud de 0,1 mg, alrededor de 100 mg de D-004. Se agregó 1 mL de la DPI, 3 mL de DME, 5 mL de n-hexano y se cerró herméticamente. Se colocó en un termostato seco a 85 ºC durante 30 min con agitación vigorosa ocasional. Se sacó del termostato y se dejó enfriar a temperatura ambiente. Se adicionaron 3 mL de la disolución de NaOH. Se agitó en la zaranda durante 15 min . Se dejó reposar durante 2 min para separar las fases y se extrajo una alícuota de 1 mL de la fase orgánica (superior) hacia un vial, se reconstituyó con 1 mL de hexano, se cerró y se agitó manualmente durante 30 s. Finalmente se tomó 1 µL por la técnica de *solvent-flush* para el análisis por CG.[6]

Método de análisis cualitativo

Como criterio de identificación por CG-DILL se determinó la retención relativa de cada uno de los ácidos siguientes: $C_{8:0}$, $C_{10:0}$, $C_{12:0}$, $C_{14:0}$, $C_{16:1}$, $C_{16:0}$, $C_{18:1}$ y $C_{18:0}$, para lo cual se tomó como referencia al patrón interno $C_{13:0}$. La retención relativa determinada fue comparada con la obtenida del análisis de sus patrones comerciales como ésteres metílicos. La identificación fue corroborada por CG-EM a través de la comparación de los espectros de cada AG con los de los patrones comerciales y los que aparecen en la biblioteca Wiley. Los fragmentos característicos (principalmente, m/z 74, 87, 143) e iones moleculares (M^+) de los ésteres metílicos de los AG fueron examinados e interpretados.

Método de análisis cuantitativo

La determinación cuantitativa se realizó por el método del patrón interno, previo cálculo de los f_i^m a partir de la DMR y utilizando como referencia al patrón interno $C_{13:0}$. Los ácidos linoleico ($C_{18:2}$) y linolénico ($C_{18:3}$) se cuantificaron como ácido oleico ($C_{18:1}$), para el ácido $C_{8:0}$ se utilizó el f_i^m calculado para el ácido $C_{10:0}$ y para el ácido palmitoleico ($C_{16:1}$) se utilizó el f_i^m calculado para el ácido $C_{16:0}$.

El contenido de cada compuesto (C_i) en el D-004 se determinó por el método del patrón interno,[12] mediante la ecuación siguiente:

$$C_i = \frac{A_i \cdot f_i^m \cdot m_{pi} \cdot 100}{A_{pi} \cdot m_m} \ (\%)$$

donde:

Ai área bajo el pico cromatográfico del componente a analizar.

m_{pi} es la masa de patrón interno (mg).

Api es el área bajo el pico cromatográfico del patrón interno.

f_i^m es el factor másico de respuesta relativa.

m_m es la masa de la muestra.

El contenido total de D-004 se determinó por la sumatoria de los porcentajes individuales hallados. Los f_i^m se calcularon a partir del análisis cromatográfico de la DMR.

Validación

Aplicabilidad del sistema. Se realizaron seis réplicas de inyección de una muestra de D-004 siguiendo la preparación descrita anteriormente. A partir de los cromatogramas obtenidos se determinó: la resolución cromatográfica entre los ácidos C16:0-C16:1 (n = 3), la cual debía ser mayor o igual a 1; la retención relativa de cada ácido (n = 3), la que debía coincidir con la calculada con cada patrón y la repetibilidad de la inyección, para la cual el CV % de la cuantificación total (n = 6) debía ser menor que 0,8 %.

Especificidad. La especificidad del método fue determinada al comparar los cromatogramas del D-004, el estándar interno y las muestras de D-004 sometidas a condiciones propicias a la ocurrencia de degradación. Estas condiciones fueron: termólisis (103 ºC, 7 d), oxidación (1 g de D-004 en 1,5 mL de H_2O_2 al 30 % a 25ºC, 7 d), y fotolisis (254 nm a 25 ºC, 7 d); y se llevaron a cabo en ampolletas de vidrio neutro, a las cuales se les insufló nitrógeno y se sellaron (n = 3). La pureza cromatográfica de las señales fue comprobada por CG-EM.

Linealidad. El estudio constó de cinco puntos, con tres réplicas cada uno. Estos puntos representaron el 50, 80, 100, 120 y 150 % de la masa de D-004 que se emplea en el análisis de las muestras, por lo que se pesaron alrededor de 50, 80,

100, 120 y 150 mg de D-004 y posteriormente, se procedió con la preparación descrita anteriormente. A partir de las masas analizadas y las áreas obtenidas, se calculó la ecuación de regresión: y = b x + a, por el método de los mínimos cuadrados. Para ello, se graficaron las relaciones de áreas obtenidas (y = Ai/Api) en función de las relaciones de masas añadidas (y = mi/mpi), donde Ai y mi son el área y la masa del total de AG y Api y mpi son el área y la masa del patrón interno. Se realizaron pruebas estadísticas (p= 0,05) para comprobar la linealidad y proporcionalidad, para lo cual se debían cumplir los criterios siguientes: coeficiente de correlación (r) ≥ 0,990, coeficientes de variación de los factores de respuesta (CV_f) y de la pendiente (CV_b) ≤ 5 % y ≤ 2 %, respectivamente. Además, los límites de confianza del intercepto (a) debían incluir el cero.[8-11]

Exactitud. La exactitud se evaluó por un estudio de recobrado en un intervalo de 80 a 120 % de la concentración nominal de AG. Se aplicó el método de Adición de Patrón, para lo cual se utilizó la DRA, la cual simula la proporción en que se presentan estos AG en el D-004. De esta disolución, se tomaron 1, 2 y 3 mL y se añadieron a tubos de ensayos (n = 3). Luego se llevaron a sequedad a 40 °C con un flujo suave de N2 y se adicionaron 60 mg aproximadamente de D-004. Se analizaron en paralelo las muestras de D-004 sin y con adición de la mezcla patrón de AG. La diferencia de resultado de "muestra + patrón" menos "muestra" se comparó con la cantidad añadida. Con el objetivo de comprobar si la concentración afectaba los resultados se realizó una prueba de Cochran para p= 0,05. Los recobrados fueron calculados [(cantidad encontrada/cantidad añadida) x 100 %] y se les realizó una prueba t de *Student* (p =0,05) para comprobar si existían diferencias significativas con el 100 %, según la ecuación siguiente: [8-11]

$$t_{exp} = \frac{|100 - \bar{R}|}{CV} \sqrt{n}$$

donde:

$\bar{R}$ es el recobrado promedio obtenido.

n es el número de réplicas.

Precisión. Este parámetro se determinó mediante ensayos de repetibilidad (un mismo analista realizó 10 réplicas de análisis de la misma muestra, en el mismo día y en el mismo equipo) y de precisión intermedia (dos analistas analizaron tres muestras independientes con cuatro réplicas en tres días diferentes, en el mismo equipo). Se calcularon los CV (%) de la determinación de cada ácido y del contenido total, y se halló además, el límite de confianza (LC= media ± t x $DE/n^{1/2}$) de la determinación del contenido total de ácidos para p= 0,05. Para determinar si hubo diferencias significativas, se realizó una prueba ANOVA de dos vías (p= 0,05). Además, se consideró como criterio que los CV deberían ser ≤ 2 %.[8-11]

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El procedimiento analítico permitió una determinación rápida, confiable y reproducible de los AG que componen el D-004 ingrediente activo. Debido a que los f_i^m de los AG individuales estuvieron alrededor de la unidad, por lo que se asumió que el $f_i^m = 1$ para el cálculo cuantitativo de cada AG, lo cual coincide con lo descrito para el análisis de AG por CG con DILL[6,7] y demuestra que en el proceso de inyección no ocurren efectos discriminatorios.

Al estudiar la aplicabilidad del sistema, se comprobó que la resolución cromatográfica entre los ácidos $C_{16:1}$ y $C_{16:0}$ en las tres determinaciones fue mayor que el límite de aceptación (1,0); lo cual garantizó una separación adecuada de las señales de interés (figura 1, tabla 1). La determinación del contenido total de AG en las seis réplicas de inyección presentó un CV de 0,5 %, inferior al límite de aceptación (0,8%).

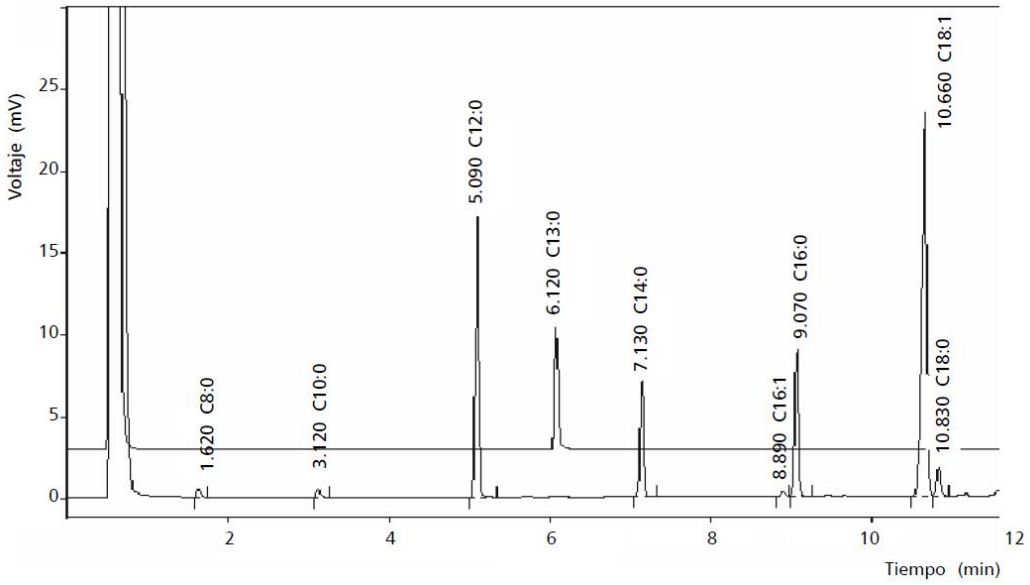


Figura 1. Superposición de los perfiles cromatográficos de D-004 (superior) y ácido tridecanoico ($C_{13:0}$) utilizado como estándar interno. Todos analizados como ésteres metílicos

Tabla 1. Resolución cromatográfica $C_{16:1}$-$C_{16:0}$ (n = 3) y cuantificación (n = 6).

Réplica	$R_{16:1-16:0}$	Contenido de AG (%)
1	1,47	90,6
2	1,50	90,8
3	1,54	91,2
4	—	90,9
5	—	91,6
6	—	91,7
CV (%)	0,50	

También, las retenciones relativas calculadas (n=3) coincidieron con las obtenidas para los patrones de referencia, todo lo cual permitió comprobar que el sistema analítico cumplía con los criterios de aplicabilidad para ser utilizado en la validación del método.

Especificidad. En los cromatogramas obtenidos, se observó una adecuada resolución entre las señales correspondientes a los AG que componen el D-004 ingrediente activo. No se detectó interferencia con el patrón interno $C_{13:0}$ (figura 1), lo cual permitió su empleo como sustancia de referencia. Al analizar los cromatogramas de las muestras sometidas a condiciones de estrés no se observó la aparición de ninguna señal que interfiriera con los analitos de interés (figura 2). A su vez, se comprobó por CG-EM la pureza cromatográfica de las señales correspondientes a las muestras analizadas, con lo que se descartó el solapamiento de posibles productos de degradación u otras interferencias con los AG que componen el D-004. El método, por tanto, demostró ser específico para el análisis del D-004, incluso al ser este sometido a condiciones extremas, por lo que puede ser utilizado en estudios de estabilidad.

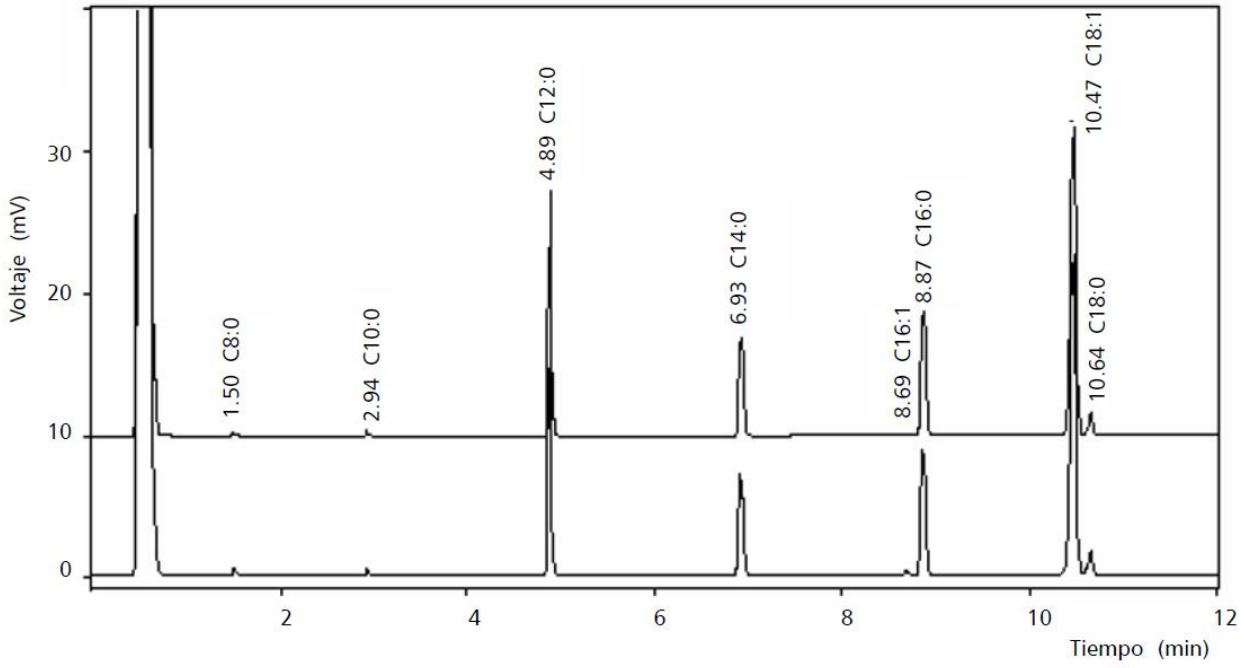


Figura 2. Superposición de perfiles cromatográficos de D-004 (superior) y D-004 sometido a condiciones de degradación (termólisis).

Linealidad. La ecuación de regresión calculada a partir de relaciones de masas analizadas y las relaciones de áreas obtenidas (tabla 2) para el total de AG fue:

$y = (0{,}914 \pm 0{,}012)\, x - (0{,}080 \pm 0{,}121)$,

con intervalos de confianza calculados para un 95 % de confiabilidad. El coeficiente de correlación (r= 0,999) fue superior al límite de aceptación (0,990), el CV de los factores de respuesta (CV_f = 0,8 %) y el CV de la pendiente (CVb = 0,6 %) fueron menores que los límites de aceptación (5 y 2 %,

respectivamente), y el intervalo de confianza del intercepto incluyó el cero, indicando la ausencia de sesgo. Dichos parámetros cumplieron con los criterios exigidos,[8-11] por lo que se pudo considerar que el método es lineal en el intervalo de masas estudiado.

Tabla 2. Resultados del ensayo de linealidad del método.

m_i/m_{pi}	A_i/A_{pi}
4,7	4,2
5	4,5
4,9	4,4
8,2	7,3
8	7,3
8,2	7,4
10,1	9,2
10	9,1
10,1	9,2
12,2	11
12,2	11
12,1	11
14,7	13,4
14,8	13,5
14,7	13,4

Exactitud. En este ensayo los recobrados promedios obtenidos estuvieron entre 100,4 y 100,8 % (tabla 3). Al aplicar la prueba estadística *t* se encontró que no había diferencias significativas entre los recobrados y el 100 %, al ser las t_{exp}. inferiores a las *t* tabuladas para un 95 % de confiabilidad (4,30 para los puntos individuales y 2,31 para el promedio). También se detectó que las varianzas de las determinaciones en las diferentes concentraciones utilizadas eran equivalentes, al ser la G_{exp}. (0,59) < G_{tab}. (0,87), lo cual indica que el factor concentración no influyó en la variabilidad de los resultados. En tal sentido, se encontró que existía una adecuada correlación entre las masas teóricas y las encontradas en la práctica (mg), al ser r= 0,999 y p < 0,000 1. La ecuación de regresión fue:

$$y = (1{,}016 \pm 0{,}041)\, x - (0{,}241 \pm 1{,}575),$$

lo cual demuestra que la pendiente incluye al 1 y al quedar incluido el cero en el intervalo de confianza del intercepto no existe sesgo.[8-11] Estos resultados confirman que el método es exacto en todo el intervalo de concentraciones estudiado.

Tabla 3. Resultados del estudio de exactitud del método (n = 3).

Añadida	Masa encontrada (mg)			Recobrado medio (%)	t_{exp}
	1	2	3		
17,9	17,4	18,6	17,8	100,4	0,23
35,7	36,4	36,1	35,5	100,8	1,19
53,6	52,9	55,3	53,6	100,6	0,48
Total	100,6	0,93			

Precisión. En el ensayo de repetibilidad los CV variaron de la forma esperada, de acuerdo con los contenidos individuales de los AG del D-004 (tabla 4). Así, la dispersión más alta se obtuvo para el componente que se encuentra en menor proporción: el $C_{8:0}$, sin embargo esto no afectó la dispersión de la determinación para el total, cuyo CV= 0,4 % asegura la repetibilidad de los resultados al ser aplicado el método, pues es inferior al límite de aceptación comúnmente exigido para este tipo de análisis (2 %).[8-11] Al estudiar la precisión intermedia (tabla 5), la determinación realizada por los dos analistas en los tres días de estudio (n= 24) presentó un CV= 0,6 %, resultado inferior al límite de aceptación (2 %);[2] lo que indica que los factores *analista* y *día* no influyeron en la precisión de los análisis. También se constató, mediante la prueba de ANOVA, ausencia de diferencias significativas entre ambas series de resultados en cuanto a la determinación del contenido de AG totales (p= 0,43), lo cual confirma la adecuada precisión del método. Los LC calculados en este ensayo fueron: (90,6 ± 0,3) %.

Tabla 4. Resultados del ensayo de repetibilidad (n = 10).

AG	Media ± DE (%)	CV
$C_{8:0}$	0,7 ± 0,05	7,1
$C_{10:0}$	0,7 ± 0,00	0
$C_{12:0}$	22,8 ± 0,18	0,8
$C_{14:0}$	9,6 ± 0,05	0,5
$C_{16:1}$	0,4 ± 0,00	0
$C_{16:0}$	12,4 ± 0,08	0,7
$C_{18:1}$ [a]	41,8 ± 0,23	0,6
$C_{18:0}$	2,6 ± 0,05	1,9
Total	91,0 ± 0,42	0,4

Tabla 5. Resultados del ensayo de precisión intermedia.

Réplicas	Contenido de AG (%)					
	Analista 1			Analista 2		
	Día 1	Día 2	Día 3	Día 1	Día 2	Día 3
1	90,5	90,7	90,4	90,4	90,5	90
2	91,1	91,5	90,4	91,3	90,1	90,2

Réplicas	Contenido de AG (%)					
	Analista 1			Analista 2		
	Día 1	Día 2	Día 3	Día 1	Día 2	Día 3
3	91,6	90,8	90,6	91,6	90	89,3
4	90,6	90,8	89,9	91,1	91,1	90,8
Media (%) ± DE	90,7 ± 0,48			90,5 ± 0,66		
CV (%)	0,5			0,7		

CONCLUSIONES

El método analítico propuesto para la determinación del contenido de los AG en el D-004 ingrediente activo, cumplió con los requerimientos para considerarse validado, demostrando ser específico, lineal, exacto y preciso. De esta manera el método puede ser utilizado en el proceso de control de calidad y estudios de estabilidad de este ingrediente activo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Bhargava S., Canda A.E. and Chapple C.R. A rational approach to benign prostatic hyperplasia evaluation: recent advances. **Curr. Opin. Urol., 14**,1-6, 2004.
2. Bent S., Kane C., Shinohara K., Neuhaus J., Hudes E.S., Godelberg H. and Avins A.L. Saw palmetto for benign prostatic hyperplasia. **N. Engl. J. Med., 354**, 557-566, 2006.
3. Laguna A., *et al.* Extracto obtenido a partir de frutos de *Roystonea regia* utilizado contra la hiperplasia prostática y la prostatitis, La Habana, Cuba, Patente No. 5239/2007.
4. Carbajal D., Arruzazabala M.L., Mas R., *et al*. Effects of D-004, a Lipid Extract from Cuban Royal Palm Fruit, on Inhibiting Prostatic Hyperplasia Induced with Testosterone or Dihydrotestosterone in a Rat Model: A Randomized, Controlled Study**. Curr. Ther. Res., 65**, 505–514, 2004.
5. Carbajal D., Molina V., Mas R. and Arruzazabala M.L. Therapeutic effect of D-004, a Lipid Extract from *Rostoynea regia* fruits, on prostate hyperplasia induced rats. **Drugs Exp. Clin. Res., 31**, 193-197, 2005.
6. Marrero D. Obtención y determinación de ácidos grasos de muy elevada masa molecular. **Revista CENIC Ciencia Químicas, 37**, 23-33, 2006.
7. Christie W.W. The preparation of derivatives of fatty acids. In Gas Chromatography and Lipids-A Practical Guide. Christie W.W. (ed.) Scotland, The Oily Press, 64-84, 1989.
8. Castro M., Gascón S., Pujol M., Sans J. and Vicente L. Validation of analytical methods; Spanish Association of the Industry Pharmacists, Catalan Section, Edited under HP license, 31, 1989.
9. Green C. A step-by-step approach to establishing a method validation program. **J. Validation Technology, 6**, 622-33, 2000.

10. ICH Harmonised Tripartite Guideline. Validation of Analytical Procedures: Methodology Q2B, 1996.
11. Regulación No. 41-2007 "Validación de métodos analíticos", Centro para el Control Estatal de la Calidad de los Medicamentos, Cuba, 2007.
12. Novák J. Quantitative Analysis by Gas Chromatography, Second Edition, Cazes J. (ed.) New York, Marcel Dekker, 79-135, 1988.

Apéndices

En este apartado se presentan cuatro apéndices que constituyen un resumen de los aspectos más importantes de los métodos abordados en este libro, presentados en forma de esquemas y tablas principalmente.

En el apéndice A se sintetizan los contenidos correspondientes al capítulo 1 (Introducción al análisis instrumental de los alimentos), fundamentalmente los relacionados con el lugar y papel de esta disciplina en las Ciencias Alimentaria, la metodología analítica general y los criterios de calidad de los métodos e instrumentos.

El apéndice B contiene los fundamentos generales de los métodos ópticos (capítulos 2-7), los procedimientos para el tratamiento de las muestras, las características del equipamiento y los métodos de cuantificación empleados.

Los aspectos más relevantes de los métodos cromatográficos se plasman en el apéndice C (capítulos 8-12), insistiendo en los principios de funcionamiento, los mecanismos de separación y los aspectos relacionados con la eficiencia de una columna cromatográfica, así como el instrumental y los procedimientos de identificación y cuantificación de la cromatografía líquida de alta resolución, la cromatografía de gases y la cromatografía en capa delgada.

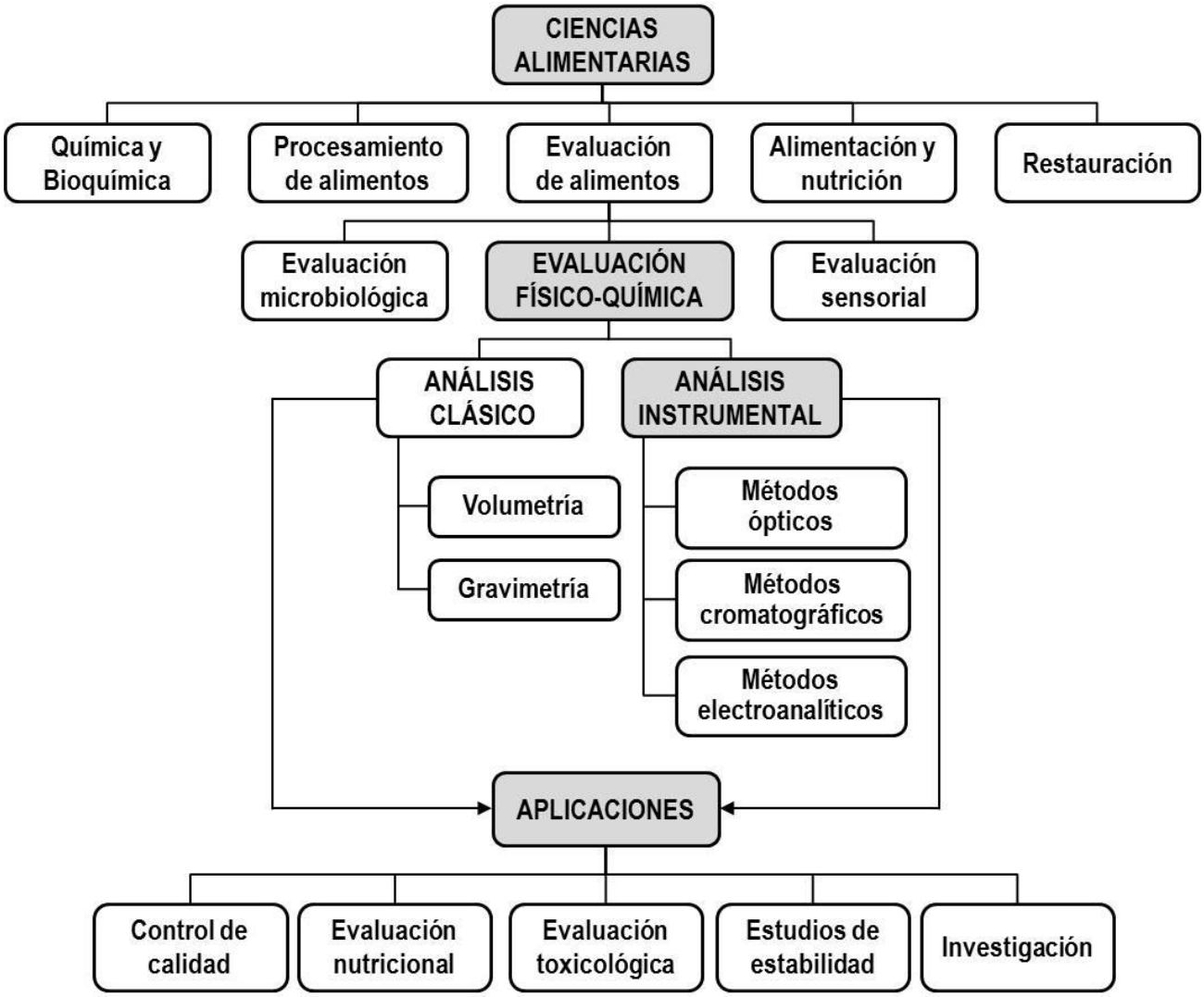
Finalmente el apéndice D recoge un apretado extracto de los métodos potenciométricos (capítulo 13) haciendo hincapié en el fundamento, los tipos de electrodos y las aplicaciones analíticas.

Los apéndices que se presentan en este apartado constituyen un intento de síntesis, sistematización e integración de los contenidos más significativos, pero en ningún momento sustituyen el estudio profundo y pormenorizado de los capítulos. El lector debe tener esto muy presente y utilizar estos resúmenes solo como un material orientador de los aspectos más importantes de cada grupo de métodos. De hecho lo verdaderamente productivo sería que el alumno elaborara su propio resumen integrador una vez que haya profundizado en el estudio del cuerpo teórico de este texto.

Apéndice A

Resumen de los aspectos generales del análisis de los alimentos

A-1. Lugar y papel del análisis de los alimentos en las Ciencias Alimentarias.



A-2. Metodología analítica

A-3. Algunos procedimientos de preparación de la muestra.

Procedimiento	**Descripción**
Homogenización	Su objetivo es contribuir a que la porción de ensayo sea representativa de la muestra bruta. Se realiza triturando y mezclando las muestras sólidas y semisólidas o por agitación fuerte en el caso de los líquidos, fundamentalmente las suspensiones como los jugos. En el caso de las emulsiones, como la leche por ejemplo, un calentamiento en baño de María facilita el proceso de homogenización.
Secado y desgrasado	Se realizan cuando el contenido de humedad y/o grasa constituyen interferencias para el análisis. El secado se efectúa sometiendo la muestra a temperaturas superiores a 100ºC en estufa, mientras que el desgrasado se realiza extrayendo la grasa con solventes orgánicos.
Dilución	Se emplea para muestras líquidas en las cuales el analito se encuentra en altas concentraciones o en productos fuertemente coloreados cuya coloración interfiere en el análisis. Es uno de los procedimientos más simples de preparación.
Extracción sólido- líquido	Consiste en la extracción del analito a partir de una matriz sólida empleando un disolvente adecuado capaz de solubilizar el componente en estudio.
Destilación	El analito se separa del resto de los componentes que pueden interferir en el análisis aplicando un procedimiento de destilación con vapor de agua.
Incineración	La incineración es el proceso de combustión de la materia orgánica que deja un residuo de material inorgánico conocido como cenizas. En algunas determinaciones de compuestos de naturaleza inorgánica se requiere eliminar primeramente el material orgánico para facilitar el análisis.
Digestión	Es un proceso de hidrólisis (ácida fundamentalmente) de la materia orgánica, que puede incluso, en función de las condiciones de tratamiento, producir agentes oxidantes que transforman la materia orgánica a dióxido de carbono, vapor de agua y otros compuestos volátiles.
Reflujo	Es una operación que se realiza con el fin de propiciar o acelerar una reacción química entre dos sustancias mediante la aplicación de calor. Consiste en colocar las sustancias reaccionantes (en disolución), en un frasco erlenmeyer de tapa esmerilada conectado a un condensador de reflujo o tubo refrigerante, a través del cual circula agua. Se aplica calor al frasco erlenmeyer, mediante mechero, plancha de calefacción o baño termostatado, y la reacción ocurre a altas temperaturas sin pérdida de los reaccionantes, por cuanto los vapores desprendidos se condensan al chocar con el tubo refrigerante y caen nuevamente en el seno de la solución.

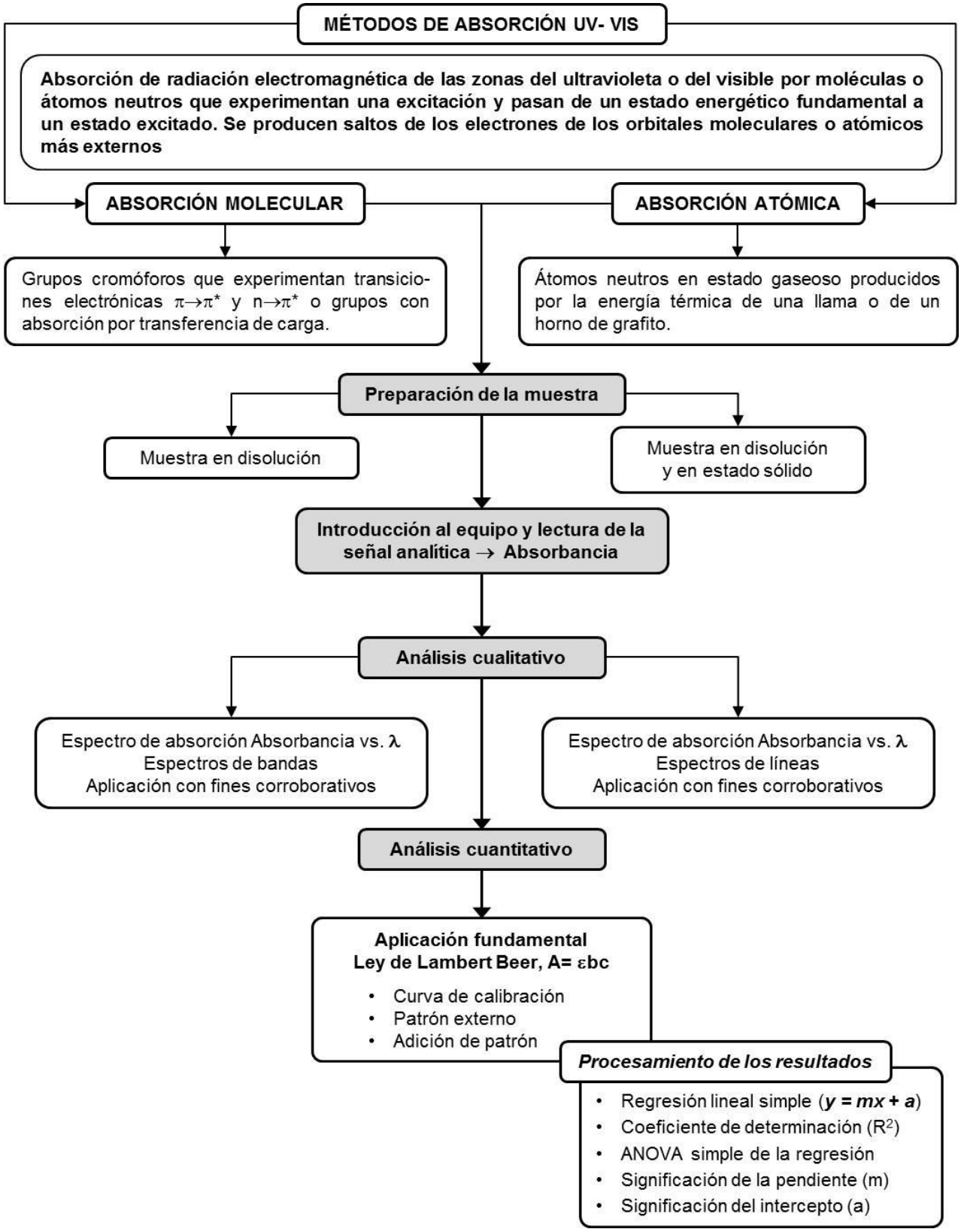
A-4. Criterios de calidad de los instrumentos y métodos de análisis.

Criterios	**Definición**	**Expresión para el cálculo**
Precisión	Describe la reproducibilidad de los resultados; es decir, la concordancia entre los valores numéricos de dos o más medidas que se han realizado exactamente de la misma forma	$CV = \frac{S}{\bar{X}} \cdot 100$
Veracidad	Es la proximidad de la concordancia entre el valor promedio obtenido en una serie de resultados de ensayo y el valor de referencia aceptado de la propiedad analítica que se está midiendo, o sea, el contenido verdadero de un analito dentro de la muestra en estudio	$\% \text{ Recuperación} = \frac{\bar{X}_{experimental}}{Valor\ real} 100$
Linealidad	Capacidad de un método o un instrumento analítico de obtener resultados proporcionales a la concentración de analito en la muestra dentro de un intervalo determinado	$y = mx + a$ R^2
Sensibilidad	Se define como la pendiente de la curva de calibrado a la concentración objeto de estudio	$S = mc + S_{bl}$
Límite de detección	Es la mínima concentración o la mínima masa de analito que se puede detectar para un nivel de confianza dado.	$3\ S_{bl}$
Límite de cuantificación	Es la cantidad más baja de analito en una muestra que puede ser cuantitativamente determinada con cierta confianza. A este límite también se le llama límite de determinación	$10\ S_{bl}$
Intervalo de concentración	Es el intervalo lineal de un método analítico o de un instrumento, que va desde la concentración más pequeña a la que se puede realizar la cuantificación (límite de cuantificación, LOQ) hasta la concentración a la que la curva de calibrado se desvía de la linealidad (límite de linealidad, LOL).	
Selectividad	Se define como la capacidad de un método o un instrumento analítico para medir exacta y específicamente el analito, sin interferencia de impurezas u otros componentes que puedan estar presentes en la muestra.	

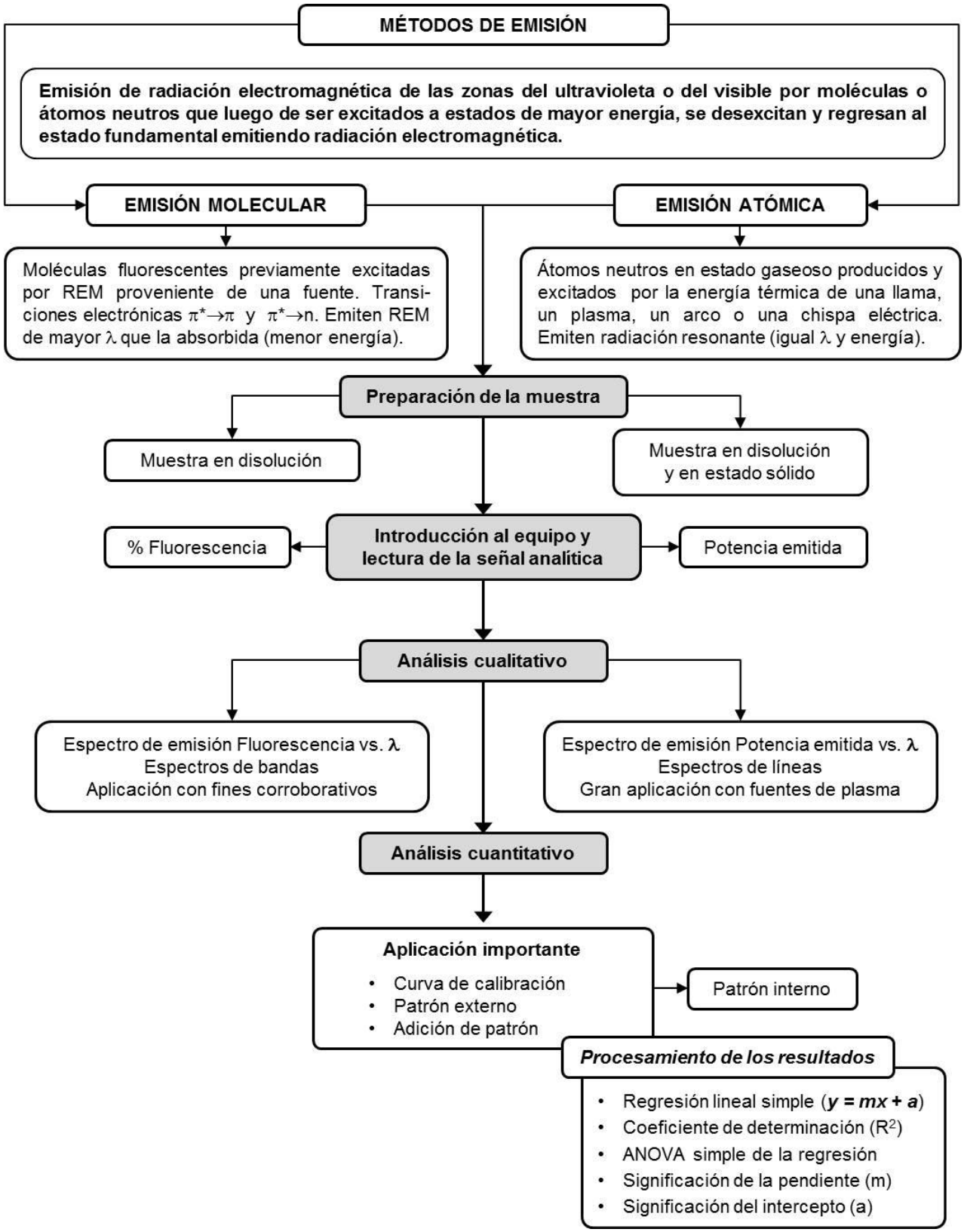
Apéndice B

Resumen de los métodos ópticos

B-1. Resumen gráfico de los métodos de absorción



B-2. Resumen gráfico de los métodos de emisión



B-3. Procedimientos más usuales para el tratamiento de muestras en los métodos ópticos estudiados.

Tipo de método	**Tratamiento de las muestras**		
	Muestra bruta	**Porción de ensayo**	**Objetivo del tratamiento**
Espectrometría molecular	Homogeneización, secado, desgrasado, otros. Medida exacta de la muestra	Disolución de la muestra. Separación del analito por métodos clásicos (extracción sólido-líquido, destilación, reflujo, clarificación, dilución, filtración, concentración, rotoevaporación, otros)	Eliminar interferencias absorbentes y poner al analito en condiciones propicias para su determinación.
		Reacciones de derivatización $\text{analito} + \underset{\text{derivatizador}}{\text{reactivo}} \leftrightarrow \underset{\text{usualmente coloreado}}{\text{derivado absorbente}}$	• Convertir un analito que no adsorbe en su estado nativo en un derivado capaz de absorber en las zonas UV o visible. • Obtener un derivado absorbente cuyo coeficiente de extinción molar (ε) es mayor al del analito en su estado nativo $\rightarrow$ aumenta sensibilidad. • La conversión del analito en un derivado coloreado con diferente estructura química, que se determina en otra región del espectro, permite su diferenciación del resto de los componentes de la matriz que absorben a longitudes de onda similares a las del analito en su estado nativo.
Espectrometría atómica	Homogeneización, secado, desgrasado, otros. Medida exacta de la muestra	**Descomposición seca:** incineración en mufla a altas temperaturas (500-550 ºC) y posterior disolución de las cenizas obtenidas en ácidos fuertes. **Digestión húmeda:** tratamiento de la muestra con ácidos minerales en caliente, los cuales oxidan la materia orgánica resultando una disolución contentiva del material inorgánico. **Digestión por interacción con microondas:** muestra mezclada con ácidos minerales u oxidantes fuertes, se introduce en horno de microondas, ocurre digestión de la materia orgánica. **Sonicación:** La muestra mezclada con ácidos fuertes se coloca en un baño de ultrasonido. Hay formación de OH* y de H_2O_2 ocurriendo digestión de la materia orgánica. Algunas muestras se aspiran directamente sin preparación previa y otras pueden analizarse en estado sólido	Eliminar la materia orgánica facilitando el proceso de obtención de átomos neutros.

B-4. Características de los instrumentos empleados en los métodos ópticos estudiados.

Componentes	Espectrofotómetros de absorción molecular UV-Vis	Espectrofotómetros de absorción atómica	Espectrofluorómetros (emisión molecular)	Espectrofotómetros de emisión atómica
Fuente de radiación	Construcción: lámparas de wolframio para el visible y deuterio para el UV. Emiten radiación policromática. Función: provoca la excitación del analito por absorción de REM.	Construcción: lámparas de cátodo hueco construidas del mismo elemento que se analiza. Emiten radiación monocromática. Función: provoca la excitación del analito por absorción de REM.	Construcción: lámparas de arco de mercurio (254, 302, 313, 546, 578, 691 y 773 nm) o lámparas de arco de xenón (300 a 1300 nm). Función: provoca la excitación del analito por absorción de REM.	---
Selector de λ	Monocromadores que aíslan una λ de la radiación policromática proveniente de la fuente. Se ubican entre la fuente y la zona de la muestra.	Monocromadores que eliminan las interferencias producidas por la emisión de radiación en la llama o en el horno de grafito. Se ubican después de la zona de la muestra.	Filtros de interferencia. Se emplean 2 selectores de λ: un selector de la λ de excitación encargado, ubicado entre la fuente y la zona de la muestra, y un selector de la λ de emisión que aisla la λ de máxima fluorescencia.	Monocromadores que eliminan las interferencias producidas por la emisión de radiación en la llama, el plasma, el arco o la chispa eléctrica. Se ubican después de la zona de la muestra.
Zona de la muestra	La muestra en disolución está contenida en cubetas de vidrio o cuarzo, para lecturas en las zonas del visible o el UV-vis, respectivamente. Las moléculas del analito absorben REM proveniente de la fuente y se excitan a niveles de mayor energía	La muestra se atomiza sobre una llama u horno de grafito cuya función es obtener átomos neutros en estado gaseoso. Los átomos del elemento objeto de estudio absorben REM monocromática proveniente de la fuente y se excitan a niveles de mayor energía.	La muestra en disolución está contenida en cubetas de vidrio o sílice, para lecturas en las zonas del visible o el UV-vis, respectivamente. Las moléculas del analito absorben REM proveniente de la fuente y se excitan a niveles de mayor energía. En el proceso de desexcitación emiten REM de mayor λ que la absorbida.	La muestra se atomiza sobre una llama, un plasma de argón, un arco o una chispa eléctrica, cuya función es obtener átomos neutros en estado gaseoso y a la vez producir una excitación térmica de estos. En el proceso de desexcitación, los átomos emiten REM de λ característica.
Detector	Detectores de fotones que convierten la radiación electromagnética en corriente eléctrica			
Registro y proceso de datos	Registra la señal analítica Absorbancia	Registra la señal analítica Absorbancia	Registra la señal analítica Fluorescencia	Registra la señal analítica Potencia emitida
	En la actualidad el registro de la señal analítica se acopla a sistemas computarizados que almacenan la información, realizan cálculos cuantitativos y poseen enormes bases de datos de espectros de diferentes sustancias, que permiten realizar comparaciones con fines cualitativos			

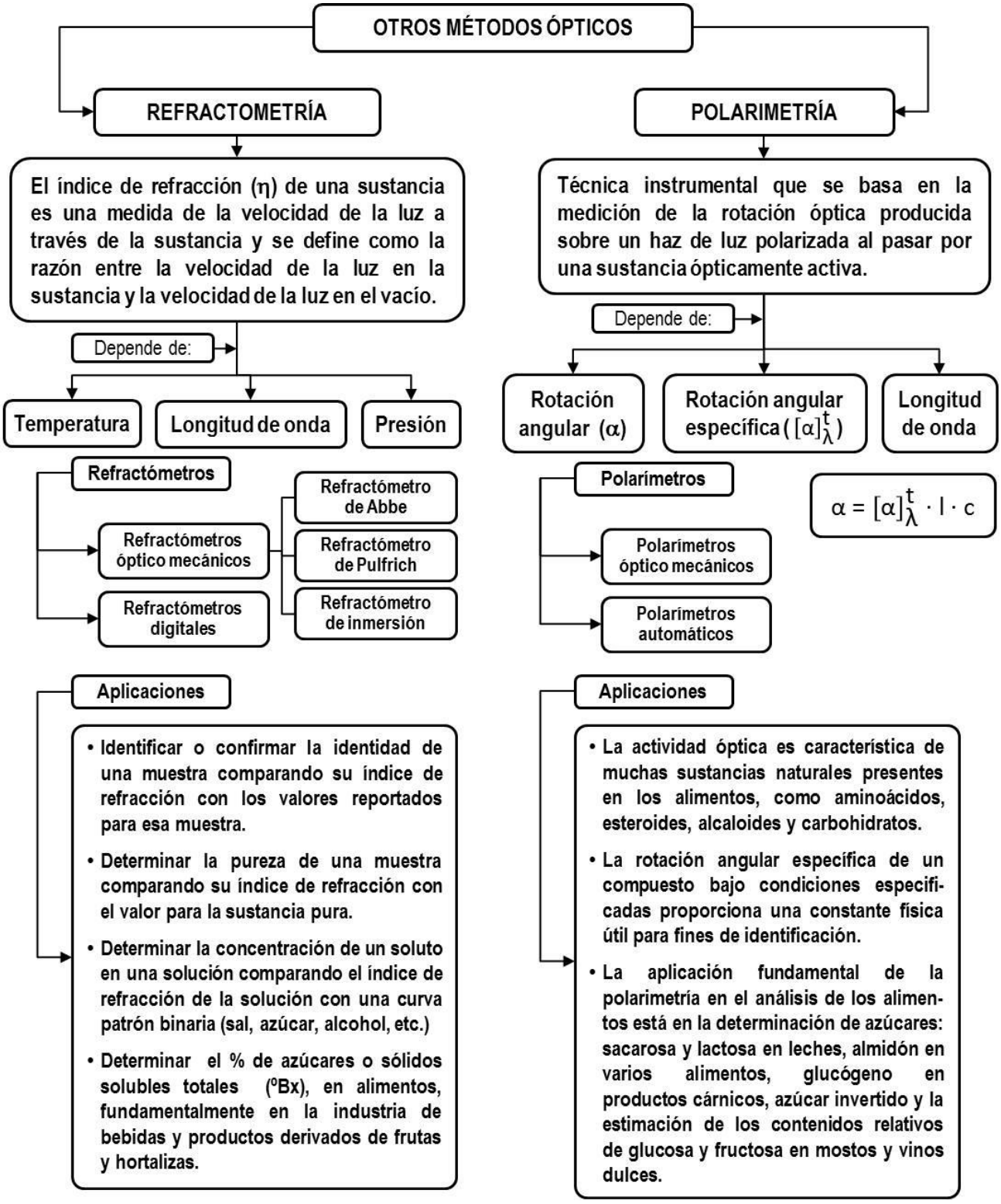
B-5. Resumen de los procedimientos de cuantificación empleados en los métodos ópticos estudiados

Procedimiento de cuantificación	**Descripción del procedimiento**	**Procesamiento de los resultados**	**Análisis estadístico**	**Aplicaciones**
Curva de calibración	Preparación de disoluciones de un patrón de referencia del analito a concentraciones crecientes y exactamente conocidas. Lectura de la señal analítica, de las disoluciones de los patrones y de la muestra.	Regresión lineal simple al juego de valores: concentración del patrón de referencia vs. señal analítica. Obtención de la ecuación de regresión ***y= mx +a***, donde y= señal analítica obtenida para la muestra	• R^2 cercano a 1 • Anova: significativo • Pendiente: significativa • Intercepto: estadística-mente igual a cero	• Absorción molecular UV-Vis • Absorción atómica • Emisión atómica • Fluorometría
Adición de patrón	Preparación de disoluciones de un patrón de referencia del analito a concentraciones crecientes y exactamente conocidas, las cuales se adicionan a réplicas de una disolución de la muestra. Lectura de la señal analítica de las disoluciones de los patrones + muestra y de la disolución de la muestra.	Regresión lineal simple al juego de valores: concentración del patrón de referencia vs. señal analítica. Obtención de la ecuación de regresión ***y= mx +a***, donde y= 0	• R^2 cercano a 1 • Anova: significativo • Pendiente: significativa • Intercepto: estadística-mente igual a la señal analítica obtenida para la disolución de la muestra	
Patrón externo	Preparación una única disolución de un patrón de referencia del analito a concentración exactamente conocida. Lectura de la señal analítica de la disolución del patrón y de la muestra.	Conc. PR ---------- Señal PR Conc. M ---------- Señal M $\text{Conc. M} = \frac{\text{Conc. PR} \cdot \text{Señal M}}{\text{Señal PR}}$	---	
Patrón interno	Preparación de disoluciones de un patrón de referencia del analito a concentraciones crecientes y exactamente conocidas a las cuales se adiciona una sustancia patrón interno que no esté en la muestra. Lectura de la señal analítica de los patrones y del patrón interno así como la señal analítica del analito y del patrón interno en la muestra.	Regresión lineal simple al cociente de la señal analítica obtenida para el patrón de referencia entre la señal analítica obtenida para el patrón interno. Obtención de la ecuación de regresión ***y= mx +a***, donde $y = \frac{\text{señal del analito en la muestra}}{\text{señal del PI en la muestra}}$	• R^2 cercano a 1 • Anova: significativo • Pendiente: significativa • Intercepto: estadística-mente igual a cero	• Emisión atómica

B-6. Parámetros estadísticos a considerar para verificar el ajuste del modelo a los resultados experimentales en los procedimientos analíticos de curva de calibración, adición de patrón y patrón interno.

Parámetros estadísticos	**Resultados que expresan el ajuste del modelo**	**Significado práctico de los parámetros estadísticos calculados**
Coeficiente de determinación (R^2)	Cercano al valor 1	Expresa linealidad. Indica la proporción entre el error explicado por la regresión con respecto al error total.
Anova simple de la regresión	Significativo	Expresa linealidad. Indica la proporción entre el error explicado por la regresión con respecto al error no explicado.
Prueba de hipótesis para la pendiente	Pendiente significativa	Expresa la variación significativa de la señal analítica (absorbancia, potencia emitida, fluorescencia) con el incremento de la concentración de los patrones de referencia.
Prueba de hipótesis para el intercepto	Intercepto no significativo	Curva de calibración y patrón interno: Expresa que la recta parte del origen, es decir, que el intercepto es igual a cero. La significación del intercepto es con respecto a cero.
		Adición de patrón: Expresa que la recta parte del valor de la señal analítica correspondiente a la lectura de la muestra (absorbancia, potencia emitida, fluorescencia). La significación del intercepto es con respecto a la señal obtenida para la muestra.

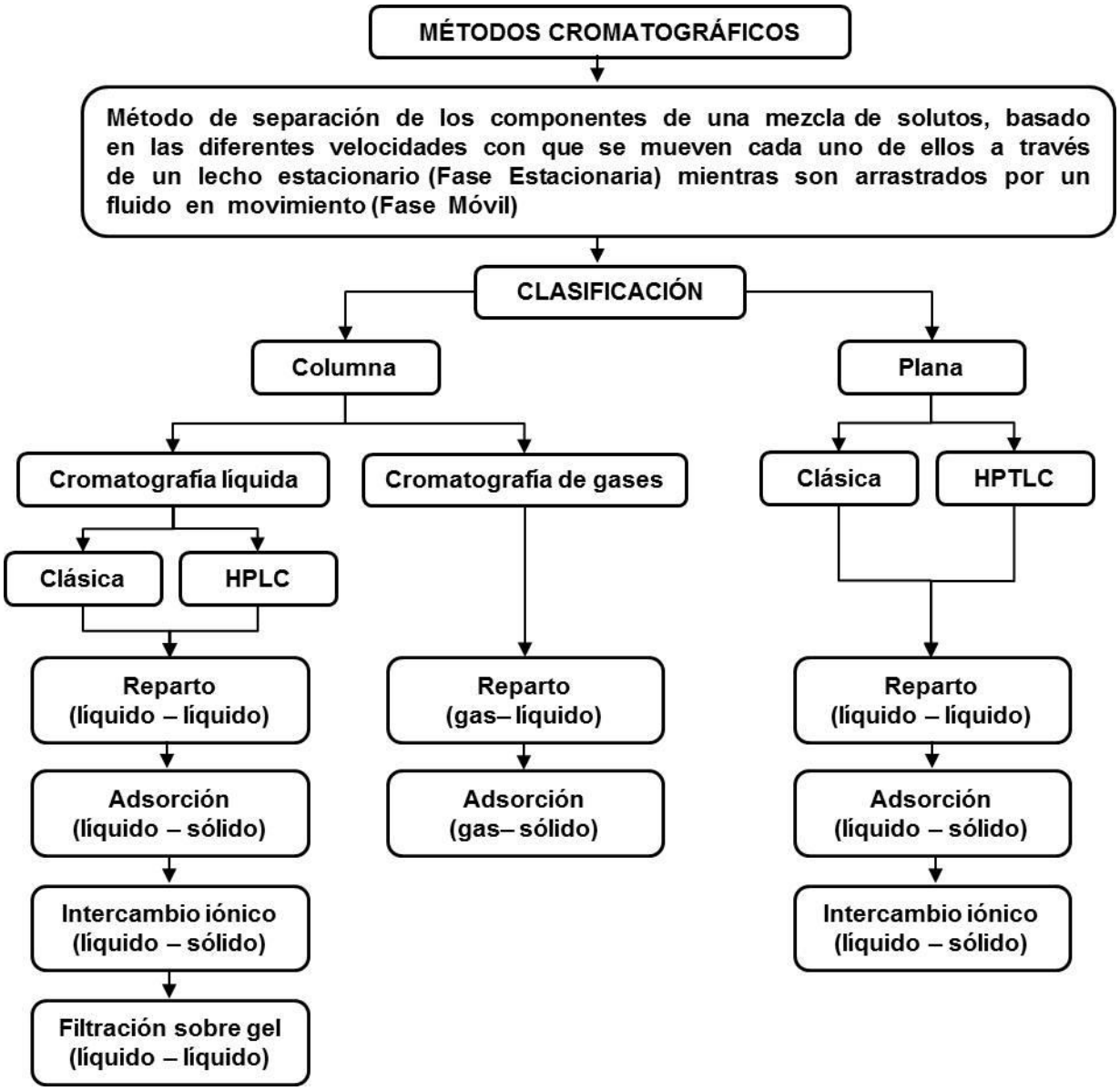
B-7. Resumen gráfico de los métodos refractométricos y polarimétricos.



Apéndice C

Resumen de los métodos cromatográficos

C-1. Resumen gráfico de la clasificación de los métodos cromatográficos



C-2. Mecanismos de separación en cromatografía

Mecanismos	Fundamento	Aplicaciones
Reparto	Dicho procedimiento se fundamenta en el fenómeno de reparto, es decir, en la distribución de una mezcla de solutos (sustancias que se desean separar) entre 2 fases inmiscibles. El reparto o distribución del soluto tiene lugar, atendiendo a su solubilidad preferencial (lo cual depende de su polaridad), entre la fase estacionaria (FE) líquida unida a un soporte sólido inerte, y la fase móvil (FM) que resulta ser el disolvente que fluye a través de la FE y que puede ser un líquido o un gas. En dependencia de la polaridad de los solutos ocurrirá la separación. Aquellos más solubles en la FM se moverán con mayor velocidad mientras que los más solubles en la FE quedarán más tiempo retenidos. En cromatografía líquida,	HPLC, CCD y Cromatografía de gases
Adsorción	La separación se realiza en virtud de las diferencias de comportamiento de las sustancias que desean separarse, atendiendo a su adsorción preferencial por la superficie de un sólido (FE) mientras se mueven por la acción de un disolvente (FM) que puede ser un líquido o un gas. Cuando la muestra disuelta en la FM se pone en contacto con las primeras capas de adsorbente, este retiene parcialmente al sólido, estableciéndose con rapidez un equilibrio entre la cantidad de muestra en la FM y la retenida por el adsorbente (FE). Este equilibrio es dinámico y reversible. La FE adsorbe los componentes de la mezcla de sustancias que desean separarse, mientras que la FM será la encargada de desorberlos. En dependencia de la fortaleza con que los compuestos se adsorban a la FE, la FM podrá desorberlos (arrastrarlos) con mayor o menor facilidad. Es este fenómeno el que posibilita que los solutos puedan ser separados, dado que, en función de su afinidad por la FE, los mismos se moverán a diferentes velocidades.	HPLC, CCD y Cromatografía de gases
Intercambio iónico	La interacción que tiene lugar es de naturaleza iónica, es decir los componentes de la mezcla que se desean separar tienen que estar en forma de iones cargados. La FE son compuestos orgánicos sintéticos llamados resinas, que poseen cargas positivas o negativas y están unidos a contraiones lábiles de carga opuesta que son desplazados con facilidad por los iones de la muestra, los cuales interaccionan con la resina y ocupan sus centros activos (positivos o negativos) luego de intercambiarse con los contraiones. Las resinas intercambiadoras pueden ser catiónicas o aniónicas, en dependencia de su carga y de los solutos que intercambien. Las resinas catiónicas poseen grupos funcionales cargados negativamente y se emplean para separar iones de carga positiva (de ahí su nombre de catiónicas) que son atraídos por la resina y se intercambian con los contraiones lábiles. Las resinas aniónicas están por el contrario cargadas positivamente y se emplean para separar iones de carga negativa (de ahí su nombre de aniónicas) que se intercambian igualmente con los contraiones lábiles. La FM es un disolvente que contiene iones de carga igual a la de los solutos que se quieren separar y están interactuando con la resina (positiva o negativa); entonces se efectúa un segundo intercambio iónico desplazando a los solutos de los centros activos de la fase estacionaria y eluyendolos.	HPLC y CCD
Filtración sobre gel	Este tipo de cromatografía se usa en la separación de mezclas de compuestos en función de la masa molecular de estos y es aplicable a compuestos con masas moleculares superiores a 2000. La FE es un gel formado por gránulos o perlas con estructura parecida a un tamiz que contienen poros de diferente tamaño. El mecanismo de separación consiste en que la solución de la muestra se hace pasar a través del gel que posee un tamaño de poro determinado. Las moléculas de alto peso molecular con tamaño superior al de los poros de las partículas del gel no pueden penetrar en los mismos (se dice que son excluidas) y se mueven libremente a través de la fase acuosa en el exterior de los gránulos, entre los espacios interpartícula, mientras que las de tamaño inferior al de los poros se introducen en estos y ven obstaculizado su paso a través del gel, por lo que su avance a través de la columna se retrasa. La FM es generalmente agua o buffer. En general el orden de elución está dado por el tamaño (o la masa molecular). Las moléculas grandes eluyen primero y le siguen las demás en orden decreciente de sus masas moleculares.	HPLC

C-3. Eficiencia de una columna cromatográfica

C-3.1. Algunos conceptos y parámetros cromatográficos de interés

Parámetro	Significado	Expresión
Eficiencia	La eficiencia de una columna cromatográfica está dada por su capacidad para lograr la separación de dos o más solutos con una buena resolución en el menor tiempo posible, en dependencia de la complejidad de la mezcla a separar.	
Tiempo de retención (*tr*)	El tiempo de retención (*tr*) de un analito dado mide el lapso de tiempo que media entre la introducción de la muestra y el instante en que la respuesta del detector alcanza su valor máximo	
Resolución (*R*)	La resolución es la medida con que una columna es capaz de separar a dos solutos con tiempos de retención muy semejantes	$R_{12} = 2\left(\frac{tr_2 - tr_1}{W_2 + W_1}\right)$
Factor de capacidad (*k'*)	El factor de capacidad describe las velocidades de migración de los analitos en la columna y está relacionado con la constante de distribución (*Kc*) de un soluto entre 2 fases, es decir la relación de la concentración de un analito A en la fase estacionaria, respecto al valor correspondiente en la fase móvil. Se define como la relación de las masas del analito en la fase estacionaria y la fase móvil, o también como la relación del tiempo de permanencia del analito en la fase estacionaria (*t'r*) respecto al valor correspondiente en la fase móvil (*tm*)	$k' = \frac{w_E}{w_M}$ $k' = \frac{t'r}{tm}$ $k' = \frac{tr - tm}{tm}$
Selectividad (α)	La selectividad expresa la retención relativa entre los máximos de dos picos adyacentes. La selectividad es conocida como eficiencia de la fase estacionaria y en la medida que se aleje más del valor 1 mejor será la separación entre los picos, es decir la fase estacionaria es más selectiva mientras mayor es el valor de α.	$\alpha = \frac{t'r_2}{t'r_1}$

C-3.2. Teorías de la elución cromatográfica

Teoría de los platos teóricos. Considera que el empaque de una columna cromatográfica está compuesto por una serie de estrechas capas horizontales llamadas platos teóricos y se supone que en cada plato tiene lugar el equilibrio del soluto entre la fase móvil y la fase estacionaria. El movimiento del soluto y el disolvente se considera entonces como una serie de transferencias sucesivas de un plato al siguiente. La eficiencia de una columna cromatográfica será mayor en la medida que aumenta el número de platos teóricos, pues aumentará también el número de equilibrios.

En consecuencia, el número de platos teóricos (*N*) se utiliza como una medida de la eficiencia de una columna cromatográfica. Un segundo término, la altura equivalente de un plato teórico (*H*) también sirve para este fin. La relación entre ambos parámetros es la siguiente:

$$N = \frac{L}{H}$$

donde *L* es la longitud del empaque de la columna

El número de platos teóricos de una columna puede calcularse experimentalmente con los datos de un pico cromatográfico, según:

$$N = 16\left(\frac{tr}{W}\right)^2$$

donde *tr* es el tiempo de retención del soluto y *W* es la anchura del pico en la base.

La teoría de los platos teóricos fue capaz de describir las velocidades de migración de los solutos de forma cuantitativa; sin embargo, su utilidad resulta limitada porque no logró describir los efectos de las variables responsables del fenómeno de ensanchamiento de banda

Teoría cinética. Parte del hecho de que no todas las moléculas del mismo soluto se mueven a igual velocidad dentro del empaque de la columna cromatográfica. Ciertas moléculas de un soluto viajan más rápidamente que el promedio porque están un mayor tiempo en la fase móvil, mientras otras pueden retardarse debido a que permanecen un mayor tiempo en la fase estacionaria. La consecuencia de estos procesos es el ensanchamiento de bandas que afecta la resolución del cromatograma.

Causas del ensanchamiento de bandas:

- *Proceso multipaso:* Efecto del tamaño y la forma de las partículas, así como, la densidad del empacado, conduce a que las moléculas de un mismo soluto transiten por diferentes trayectorias a través del empaque de la columna Se minimiza disminuyendo el tamaño de partícula del empaque e incrementando su homogeneidad
- *Difusión longitudinal:* Tendencia de las moléculas difundir desde zonas de mayor concentración a zonas de menor concentración produciendo un ensanchamiento adicional del pico cromatográfico. Se minimiza incrementando la velocidad de flujo
- *Resistencia a la transferencia de masa:* Ocurre una transferencia de masa fuera del equilibrio. Se minimiza disminuyendo la velocidad de flujo, la viscocidad de la fase móvil y el espesor de la película de la fase estacionaria.

La ecuación de Van Deemter relaciona la eficiencia de una columna cromatográfica con la magnitud de estos tres fenómenos y proporciona una relación aproximada entre la velocidad de flujo (μ) y la altura equivalente de un plato teórico (H). Esta ecuación es aplicable tanto en cromatografía líquida como en cromatografía de gases.

$$H = A + \frac{B}{u} + Cu$$

En este caso la magnitud A se relaciona con el efecto multipaso, B es la difusión longitudinal y C es la transferencia de masa fuera del equilibrio.

De esta expresión se desprende que la eficiencia de la columna cromatográfica aumenta a medida que se hace mínimo *A, B y C,* por cuanto también se minimiza la altura equivalente de un plato teórico lo que conduce al incremento del número de platos teóricos y con ello al establecimiento de un mayor número de equilibrios del soluto entre ambas fases.

Resulta claro que es preciso llegar a un compromiso entre los factores que afectan la eficiencia cromatográfica, expresada por la ecuación de Van Deemter. Así hemos visto que la altura del plato teórico *H* crece a bajas velocidades de la fase móvil debido a difusión, mientras que ocurre lo mismo a elevadas velocidades por falta del establecimiento del equilibrio. Entre estos dos extremos hay un punto que corresponde al flujo óptimo. En la práctica se trabaja dentro de una zona bastante amplia por cierto, aunque es siempre recomendable conocer cuáles son los límites dentro de los que es factible situar la velocidad de la fase móvil en el trabajo diario

C-4. Principios de funcionamiento de los métodos cromatográficos estudiados.

Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)	**Cromatografía de gases (GLC)**	**Cromatografía en capa delgada (CCD)**
El proceso consiste en bombear a presión elevada un solvente o sistema de solventes (fase móvil) a través de una tubería capilar, por lo general de acero inoxidable. Este líquido llega a una válvula (sistema de inyección) que permite la introducción de la muestra que se desea analizar. La muestra, casi siempre una solución, se introduce mediante una jeringuilla en el sistema de inyección de volumen exacto y conocido. Accionando una válvula se logra que la solución de la muestra se mezcle con fase móvil líquida y pase a la columna cromatográfica. En su modalidad clásica la columna cromatográfica es un tubo de acero inoxidable (relleno con la fase estacionaria) de 1 *mm* a 4 *mm* de diámetro interno y longitud variable, según la necesidad analítica pero por lo general inferior a 50 *cm*. En la columna ocurre la separación cromatográfica de los componentes de la muestra. El mecanismo de separación depende de la naturaleza de la fase móvil y de la fase estacionaria y en esencia, la separación está determinada por las diferencias en afinidad de los analitos por ambas fases. A la salida de la columna se encuentra conectado el detector, que puede ser refractométrico, espectrofotométrico, electroquímico, de fluorescencia o de conductividad entre otros. La señal producida por el detector, previamente amplificada, se recibe en un registrador donde se origina el cromatograma correspondiente de señal vs. tiempo de retención. Aunque no es una parte esencial del sistema de cromatografía líquida, es posible también acoplar a la salida del detector, un colector de fracciones, con el que se puede obtener separadamente los eluatos correspondientes a un pico o un conjunto de picos según se requiera para un uso posterior.	El proceso consiste en impulsar, a una velocidad de flujo controlada, un gas portador (fase móvil) a través de una tubería capilar hasta una cámara de inyección a altas temperaturas donde se introduce la muestra que se desea analizar. La muestra se introduce en ésta cámara por inyección a través de una membrana perforable, valiéndose de una microjeringuilla. La temperatura de la cámara y la capacidad calorífica de esta permiten un rápido paso a la fase de vapor, tanto del solvente usado en disolver la muestra como de los componentes sólidos de esta. Una vez en estado de vapor, la muestra es arrastrada por el gas portador, introduciéndola y llevándola a través de la columna cromatográfica, la cual se encuentra situada en un horno aislado térmicamente a temperatura entre 50^{o}C y 350^{o}C. En la columna cromatográfica ocurre la separación de los componentes de la muestra en función de las diferencias en afinidad de los analitos por la fase estacionaria mientras son arrastrados por el gas portador. A la salida de la columna se encuentra conectado el detector, el cual es un dispositivo capaz de responder a las pequeñas variaciones en las propiedades físicas del gas portador cuando se encuentra acompañado por el analito. En general cada detector está diseñado para responder ante una variación específica del gas portador, y pueden ser de conductividad térmica, de ionización, de absorción electrónica, etc. La señal producida por el detector de naturaleza eléctrica o transformable en ella, es amplificada y enviada al registrador donde se origina el cromatograma correspondiente de señal contra tiempo de retención.	La muestra o muestras a cromatografiar se aplican, utilizando micropipetas en una placa que contiene un soporte con la fase estacionaria. La aplicación puede ser en forma de puntos o en forma de bandas. El desarrollo del cromatograma consiste en hacer pasar la fase móvil (solvente de corrida) a través de la fase estacionaria. Para ello se coloca la placa en una cámara cerrada que contiene el solvente (o sistema de solventes) que se usará en el desarrollo del cromatograma. Una vez colocada la placa dentro de la cámara cromatográfica, el solvente asciende por capilaridad arrastrando a los solutos que comenzarán a separarse en función de las diferencias de afinidad por la fase móvil y la fase estacionaria. Aquellos más afines a la fase móvil se moverán con mayor velocidad y recorrerán una mayor distancia. La detección de los compuestos separados se realiza mediante métodos de revelado físicos (fluorescencia) o químicos (reacciones de derivatización in situ) que permitan visualizar la posición de los mismos en la superficie de la capa. Los componentes separados aparecen inmovilizados en la placa como manchas.

C-5. Instrumentación empleada en cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

	Características
Fase Móvil	Está constituida por un solvente, una solución o un sistema de solventes y ha de ser compatible con el detector que se requiera para llevar a cabo la determinación. Por lo general, la FM se encuentra en recipientes de un 1 litro de capacidad, situados por encima de los demás constituyentes del sistema cromatográfico. Debe tener un alto grado de pureza y yna baja viscosidad, no obstante siempre es necesario desgasificar y filtrar los solventes empleados.
Bombas	Su función es la de extraer el solvente o sistema de solventes (FM) de su reservorio e impulsarlo a altas presiones a través del sistema cromatográfico, garantizando la velocidad de flujo. Pueden trabajar con un sistema de elución isocrático (la composición de la fase móvil no varía durante el proceso cromatográfico) o con un sistema de gradiente de elución (la composición de la fase móvil varía paulatinamente durante el proceso cromatográfico).
Sistema de inyección	La válvula de introducción de muestras es un dispositivo que permite la dosificación exacta de volúmenes conocidos de solución o muestra líquida, de forma rápida para que se mezcle con la FM que se encuentra a presión elevada y pasen a la columna cromatográfica. En la actualidad existen también los llamados automuestreadores automáticos que son equipos que pueden realizar el proceso de inyección automáticamente sin apenas atención del analista.
Precolumna	Va conectada entre la válvula de introducción de muestras y la columna analítica. Su función es servir de filtro para evitar la introducción de partículas a la columna y para retener los componentes de la muestra que se adsorberían irreversiblemente en la columna, contribuyendo así a prolongar su vida útil.
Columna	Es la parte del sistema donde se origina la separación de los componentes de la muestra y de la que depende en gran medida la eficiencia del proceso cromatográfico. Las columnas más empleadas son las clásicas (rellenas con la FE), construidas de acero inoxidable, con diámetros internos entre 2 mm y 5 mm y longitudes entre 5 y 50 cm, pero las de mayor uso son las de 25 cm. La mayoría de los rellenos (FE) usados hoy en HPLC tienen como base la sílice porosa, con sus grupos silanoles unidos químicamente a compuestos que le dan las características deseadas. En función del grupo R unido a la sílica gel las columnas serán de reparto, adsorción, intercambio iónico o filtración sobre gel. Las de mayor aplicación son las de reparto fase normal (donde los grupos R pueden ser ciano, diol y amino fundamentalmente) y las de fase reversa (donde los grupos R son cadenas alifáticas de 2, 8 y 18 átomos de carbono; conocidas como C-2, C-8 y C-18, respectivamente). Las columnas de HPLC son altamente eficientes debido al pequeño tamaño de partícula (entre 3 y 10 μm) y el elevado número de platos teóricos (12 000 platos / 5 cm)
Detector	Su función es detectar los componentes que van eluyendo de la columna cromatográfica. Los más empleados son: detector de índice de refracción, detector espectrométrico UV-Vis (λ fija, λ variable y arreglo de diodos), detector de fluorescencia, detector electroquímico y detector de conductividad. Recientemente se emplea el acoplamiento HPLC – espectrometría de masas como técnica eficaz en la identificación de la estructura de compuestos químicos. Este detector además de ofrecer el cromatograma realiza un espectro de masas a cada uno de los picos obtenidos. La interpretación de los espectros de masas brinda una información cualitativa poderosa acerca de la identidad de un compuesto.
Sistema de registro	La salida de la información producida por el detector ante el paso de la muestra, puede registrarse directamente en un cromatograma de señal vs. tiempo de retención. La introducción de las computadoras y de los software especializados permite la captación de la información cromatográfica, su almacenamiento y procesamiento en el momento que se requiera.

C-6. Instrumentación empleada en cromatografía de gases (GLC)

	Características
Gas portador	Los gases usados están contenidos normalmente en recipientes o balones de acero con capacidad real de 20 - 50 litros. La presión a la que pueden estar sometidos los gases en los balones mencionados, es relativamente baja. En todos los cromatógrafos hay dispuestos manómetros, con ayuda de los cuales es posible fijar con exactitud la presión de trabajo de los distintos gases, la cual determina la velocidad de flujo. Los gases portadores comúnmente usados son Nitrógeno, Argón, Helio, Hidrógeno y CO_2. Su elección depende del tipo de detector que se vaya a usar. La función del gas portador es únicamente transportar la muestra (en fase gaseosa) a través del sistema cromatográfico. A diferencia de la cromatografía líquida, el gas portador no participa en la separación cromatográfica como lo hace la fase móvil (sistema de solventes) en HPLC.
Sistema de inyección	La cámara de inyección se encuentra a altas temperaturas y su diseño debe permitir que las muestras que se introducen en ella, a través de una membrana perforable de goma de silicona, se vaporicen rápida y totalmente y se mezclen con el gas portador, haciéndolos entrar y avanzar a través de la columna cromatográfica. Existen varias técnicas de inyección y las más empleadas son: inyección Split (donde solo una fracción del volumen inyectado se introduce en la columna cromatográfica y el resto se desvía hacia el exterior, inyección Splitless (en el que la totalidad de la muestra que se introduce en el inyector accede a la columna) e inyección con programación de temperatura del vaporizador (en el que la muestra se inyecta en frío y después se programa la vaporización hasta un valor de temperatura preestablecido).
Columna	Existen dos tipos de columnas, las empacadas y las capilares. Las columnas empacadas o de relleno son aquellas en las que la fase estacionaria recubre a un soporte inerte, más o menos regular, el cual llena totalmente el interior de la columna; por lo general tienen una longitud entre 0,3 y 10 metros y diámetros internos entre 2 y 6 mm. Las columnas capilares están formadas por un capilar de diámetro interno muy pequeño, en cuyas paredes interiores está dispuesta la fase estacionaria; pueden tener una longitud hasta 10 veces mayor que las columnas empacadas (10 – 100 m) y un diámetro interno mucho menor (0.1 – 0.75 mm), lo que unido a la ausencia de relleno, las hace mucho más eficientes. Las más empleadas con las de sílice fundida. La cromatografía de gases de mayor aplicación es la cromatografía gas-líquido, y el mecanismo que se pone de manifiesto es el reparto. Así, las fases estacionarias son sólidos o semisólidos a temperatura ambiente pero líquidos a temperatura de trabajo.
Horno termostatado	La columna cromatográfica se encuentra situada en un horno aislado térmicamente. En la mayoría de los equipos la temperatura del horno puede fijarse en cualquier valor entre 50ºC y 350ºC. Un accesorio, llamado programador, permite variar la temperatura del horno en función del tiempo dentro de los límites permisibles del equipo. Cuando el análisis cromatográfico se realiza con el horno situado a una temperatura fija, se dice que la operación es isotérmica. Si por el contrario la temperatura varia (en forma lineal o por rampas de temperatura) se dice entonces que el análisis se realiza con programación de temperatura. La cromatografía a temperatura programada es más eficiente y se emplea en la separación de mezclas complejas con un rango amplio de puntos de ebullición entre sus componentes.
Detector	Su función es detectar los componentes que van eluyendo de la columna cromatográfica. Trabajan a altas temperaturas y los más empleados son: detector de conductividad térmica, detector de ionización por llama, detector de captura electrónica, detector termoiónico y detector fotométrico de llama. También se emplea el acoplamiento GLC – espectrometría de masas como técnica eficaz en la identificación de la estructura de compuestos químicos.
Sistema de registro	De forma análoga a HPLC, la salida de la información producida por el detector ante el paso de la muestra, puede registrarse directamente en un cromatograma de señal vs. tiempo de retención. Igualmente, los software especializados permiten la captación de la información cromatográfica, su almacenamiento y procesamiento en el momento que se requiera.

C-7. Procedimientos de identificación empleados en HPLC y Cromatografía de gases

Procedimiento de identificación	**Descripción del procedimiento**	**Aplicaciones**
Comparación de los tiempos de retención	Consiste en comparar los tiempos de retención obtenidos para un pico cromatográfico de una muestra cromatografiada, con el tiempo de retención obtenido para un patrón de referencia (PR) de la sustancia que se sospecha esté presente en la muestra	HPLC y Cromatografía de gases
Enriquecimiento de pico	Una vez cromatografiada la muestra, se añade a esta una cierta cantidad de PR del compuesto que se sospecha esté presente. La muestra con el patrón adicionado se vuelve a cromatografiar y si uno de sus picos aumenta su área es indicativo que se corresponde con el patrón adicionado. Si por el contrario aparece un nuevo pico en el cromatograma puede afirmarse que el patrón de referencia no se corresponde con ninguno de los componentes presentes en la muestra.	HPLC y Cromatografía de gases
Utilización de un detector con arreglo de diodos	Este detector es capaz de realizar un barrido en un amplio rango de longitudes de onda a cada uno de los componentes eluidos obteniendo el espectro de absorción de cada uno. Los espectros obtenidos para cada pico de la muestra se comparan con espectros de referencia, lo que permite realizar el análisis cualitativo basado no solo en las propiedades cromatográficas de los eluatos sino también, en sus características espectroscópicas	HPLC
Acoplamiento con espectrometría de masas	Es posible disponer comercialmente de cromatógrafos acoplados a espectrómetros de masas (HPLC–MS y GLC-MS), como equipos compactos, en los cuales el espectrómetro de masas se ha convertido en un detector muy valioso en la identificación y cuantificación de los componentes cromatografiados. De forma análoga al detector con arreglo de diodos el uso de computadoras y software especializados permiten en la actualidad almacenar una enorme cantidad de espectros de masas en espectrotecas y realizar comparaciones con los espectros obtenidos por el detector de cada uno de los componentes cromatografiados.	HPLC y Cromatografía de gases

C-8. Procedimientos de cuantificación empleados en HPLC y Cromatografía de gases

Procedimiento de cuantificación	**Descripción del procedimiento**	**Procesamiento de los resultados**	**Análisis estadístico**
Curva de calibración	Preparación de disoluciones de un patrón de referencia (PR) del analito a concentraciones crecientes y exactamente conocidas. Inyección de cada una de las disoluciones en el cromatógrafo, obtención de los respectivos cromatogramas e integración de los picos de los PR para obtener el área bajo la curva.	Regresión lineal simple al juego de valores: concentración del patrón de referencia vs. área bajo la curva del pico del patrón de referencia. Obtención de la ecuación de regresión ***y= mx +a***, donde y= área del pico del analito en el cromatograma de la muestra (Area pico M).	• R^2 cercano a 1 • Anova: significativo • Pendiente: significativa • Intercepto: estadísticamente igual a cero
Patrón externo	Preparación una única disolución de un PR del analito a concentración exactamente conocida. Inyección de la disolución en el cromatógrafo, obtención del cromatograma e integración del pico del PR para obtener el área bajo la curva.	Conc. PR ---------- Area PR Conc. M ---------- Area pico M $\text{Conc. M} = \frac{\text{Conc. PR} \cdot \text{Area pico M}}{\text{Señal PR}}$	---
Patrón interno	Preparación de disoluciones de un patrón de PR del analito a concentraciones crecientes y exactamente conocidas a las cuales se adiciona una sustancia patrón interno (PI) que no esté en la muestra. Inyección de las disoluciones de PR + PI en el cromatógrafo, obtención de los cromatogramas e integración de los picos del PR y del PI para obtener sus respectivas áreas bajo la curva.	Regresión lineal simple al juego de valores: concentración del patrón de referencia vs. Area PR / Area PI. Obtención de la ecuación de regresión ***y= mx +a***, donde $y = \frac{\text{Area del analito en la muestra}}{\text{Area del PI en la muestra}}$	• R^2 cercano a 1 • Anova: significativo • Pendiente: significativa • Intercepto: estadísticamente igual a cero
Normalización interna	Inyección en el cromatógrafo de la muestra, obtención del cromatograma e integración del área bajo la curva de los picos correspondientes a la muestra cromatografiada.	$\%\ componente\ \ y = \frac{A_y}{\sum_{y=1}^{y=n} Ay} \cdot 100$ donde A_y es el área de cualquiera de los *n* picos (el pico de interés) $\sum_{y=1}^{y=n} A_y$ es la sumatoria de las áreas	

C-9. Procedimientos de identificación y cuantificación empleados cromatografía en capa delgada (CCD)

		Descripción del procedimiento
Procedimientos de identificación	Comparación de los factores de retardo (Rf)	El factor de retardo (*Rf*), es la relación entre la distancia recorrida por un compuesto entre la distancia recorrida por el solvente de corrida (fase móvil). La muestra se aplica inicialmente en la placa junto a patrones de referencia (PR), por lo que al acometer el proceso de revelado se visualizan las manchas correspondientes a los componentes de la muestra y las manchas correspondientes a los PR. Se calculan entonces los valores de RF de los componentes de la muestra y de los PR. Cuando una mancha de un PR coincide con una mancha de un componente de la muestra, la identificación es positiva.
Procedimientos de cuantificación	Elución de los componentes de la placa	Consiste en raspar la zona de sílica correspondiente al componente que se desea cuantificar y trasvasarla a un recipiente donde, luego de numerosas extracciones, se realiza la medición directamente por técnicas espectroscópicas (en la zona ultravioleta del espectro si el componente es capaz de absorber o mediante una previa reacción de derivatización para obtener un compuesto coloreado que permita realizar la determinación en la zona visible del espectro). Este método se emplea muy poco debido a su pobre precisión y exactitud.
	Técnicas densitométricas	Un densitómetro es un equipo capaz de medir una señal analítica de los componentes separados y los patrones directamente "in situ" sobre la placa cromatográfica. El resultado de esta medición es un cromatograma de señal vs. distancia de migración de cada uno de los componente de la muestra, en el cual, de forma análoga a la HPLC y a GLC, el área bajo la curva de cada pico es proporcional a la concentración. La cuantificación de cualquiera de los componentes de la muestra se realiza con ayuda de una curva de calibración. Para ello se aplican en una capa nueva soluciones de un patrón de referencia correspondiente al componente que se desea cuantificar a concentraciones o masas crecientes y exactamente conocidas. Se realiza entonces la corrida cromatográfica bajo condiciones idénticas a las utilizadas para la muestra y la placa se coloca en el densitómetro para la lectura de la señal analítica de los patrones. Se obtienen entonces un número de picos equivalentes al número de soluciones patrones aplicadas en la placa cuyas áreas bajo la curva aumentan en la medida en que aumenta la concentración de los patrones. El equipo es capaz de integrar estas áreas y como resultado se obtiene un juego de datos de concentración (o masa) de los patrones vs. área bajo la curva. Esta data se procesa por regresión lineal y se obtiene una ecuación del tipo $y = mx + a$ donde ***"m"*** es la pendiente, ***"a"*** es el intercepto, ***"y"*** es el área bajo la curva del pico del componente de interés en el cromatograma de la muestra y ***"x"*** es la concentración o masa del componente de interés.

C-10. Comparación entre la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y la cromatografía de gases (GLC)

	HPLC	**GLC**
Preparación de la muestra	Métodos clásicos, SPE, SPME, Derivatización ocasional. La muestra debe filtrarse siempre y es disuelta en la fase móvil.	Métodos clásicos, SPE, SPME, Derivatización frecuente. El disolvente debe ser volátil y usualmente con un punto de ebullición menor al de los analitos.
Volatilidad de la muestra	Ningún requisito de volatilidad.	La muestra debe ser volátil o volatilizable.
Polaridad de la muestra	Separa compuestos polares y no polares.	Separa compuestos polares y no polares.
Labilidad térmica de la muestra	El análisis puede realizarse a temperatura ambiente o por debajo.	La muestra debe resistir las temperaturas elevadas del inyector y la columna.
Peso molecular de la muestra	En teoría no existe límite superior, en la práctica la solubilidad es el límite.	Usualmente menor que 500 uma.
Volumen de inyección	En función del diámetro interno de la columna.	En función del tipo de columna.
Mecanismos de separación	Adsorción, Reparto, Intercambio iónico y Filtración sobre gel. En la separación participan tanto la FM como la FE.	Adsorción y Reparto En la separación participa la FE. La FM es solo un portador de la muestra.
Columnas	Empacadas.	Empacadas y capilares.
Sistema de elución	Isocrático y Gradiente.	Isotérmico y Temperatura programada.
Detectores	UV-Vis, Arreglo de diodos, Fluorescencia, Índice de refracción, otros. Acoplamiento HPLC-MS.	Conductividad térmica, Ionización por llama, Captura de electrones, otros. Acoplamiento GLC-MS.
Identificación	Comparación de los tr, Enriquecimiento de pico, Arreglo de diodos, Acoplamiento HPLC-MS.	Comparación de los tr, Enriquecimiento de pico, Acoplamiento GLC-MS.
Cuantificación	Patrón externo, Curva de calibración, Patrón interno, Normalización de área.	Patrón externo, Curva de calibración, Patrón interno, Normalización de área.

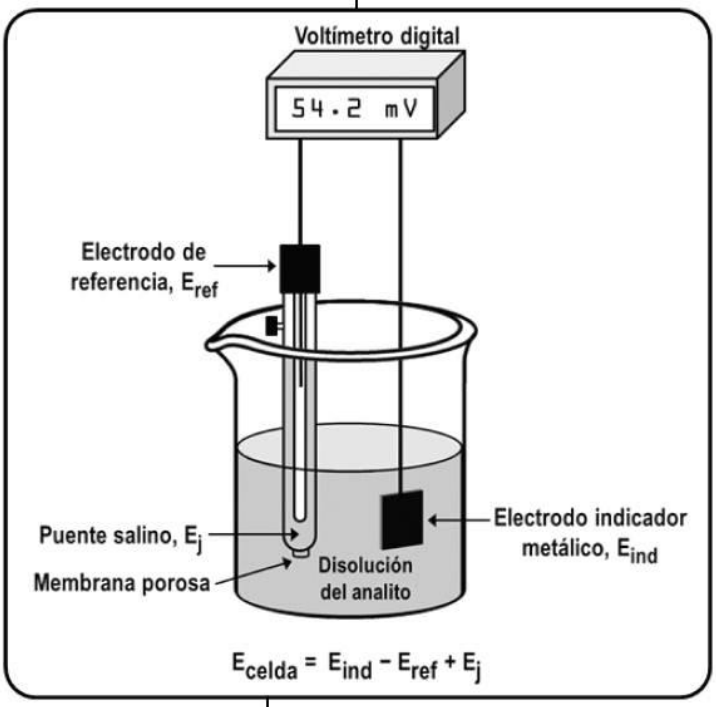
Apéndice D

Resumen de los métodos potenciométricos

D-1. Principios y electrodos

POTENCIOMETRÍA

En todas las determinaciones potenciométricas hay un sistema electródico constituido por dos electrodos: un electrodo indicador, que es el que mide la variación del potencial según varía la concentración del ion que se determina (analito) y otro electrodo de referencia, no polarizable y de potencial constante.



ELECTRODOS

- **Electrodos de referencia**
  - **Electrodos de calomel**
  - **Electrodos de plata/cloruro de plata**
- **Electrodos indicadores**
  - **Electrodos metálicos**
  - **Electrodos de membrana**
    - **Membrana de vidrio**
    - **Membrana líquida**
    - **Membrana en estado sólido**
    - **Membrana permeable a los gases**

D-2. Aplicaciones de los métodos potenciométricos

Métodos potenciométricos directos:

Requiere sólo la comparación del potencial desarrollado por el electrodo indicador en la disolución problema con el potencial obtenido cuando se sumerge en una o más disoluciones patrón del analito. Debido a que la mayoría de los electrodos indicadores son selectivos, normalmente no se requieren etapas de separación previas.

Valoraciones potenciométricas:

Comprende todos los tipos de valoraciones potenciométricas, que en su esencia son las mismas que fueron estudiadas en el análisis químico clásico. La diferencia estriba en que en el análisis clásico se emplean indicadores para detectar el punto final de la valoración mientras que en las valoraciones potenciométricas, el potencial de un electrodo indicador adecuado se emplea con comodidad para establecer el punto de equivalencia. En dependencia del tipo de electrodo indicador que se emplee pueden realizarse valoraciones por neutralización, precipitación, formación de complejos y oxidación reducción

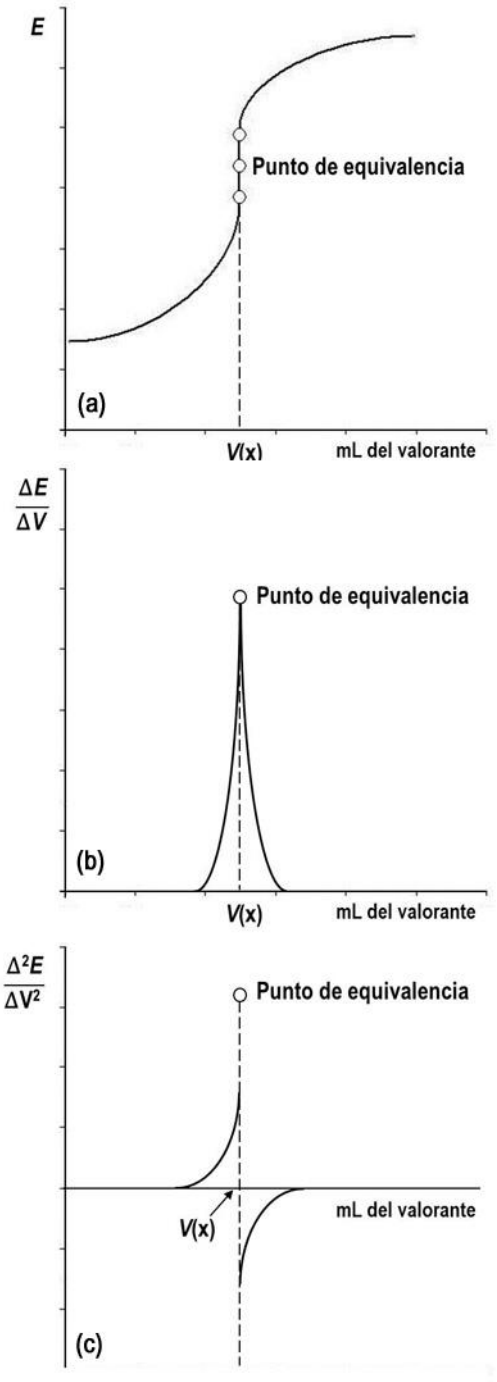
Pueden utilizarse varios métodos para detectar el volumen consumido de la disolución valorante para alcanzar el punto final en una valoración potenciométrica.

El método más directo es la construcción de una gráfica de potencial en función del volumen consumido de valorante (figura a), cuyo comportamiento es idéntico a las curvas obtenidas por valoraciones clásicas. El punto medio del salto brusco de potencial en la gráfica de valoración se estima de forma visual y se toma como el punto final, extrapolando hacia el eje *x* para la determinación del volumen consumido, *V*(x), y con estos datos aplicar la ley fundamental de la volumetría en cualquiera de sus variantes.

Un segundo procedimiento, más exacto, consiste en calcular el cambio del potencial por unidad de cambio en el volumen consumido de valorante, es decir $\Delta E/\Delta V$ (primera derivada). Una representación gráfica de este parámetro permite obtener un punto final más definido (figura b) con un punto de inflexión en el que resulta más fácil determinar el volumen consumido del valorante, *V*(x).

El tercer método consiste en representar la segunda derivada ($\Delta^2 E/\Delta V^2$) en función del cambio en el volumen consumido del valorante (figura c).

Es particularmente útil para la valoración de disoluciones coloreadas, turbias o muy diluidas, en las que no es posible emplear un indicador.



Análisis Instrumental de los Alimentos

La importancia de la alimentación como necesidad vital es un hecho incuestionable conocido por todos. Ahora bién, es necesario saber como nos alimentamos, es decir cuál es la calidad de los alimentos que ingerimos, sobre todo por la gran relación que se ha demostrado que tiene la alimentación con la salud.

Así, resulta de gran relevancia la determinación de la composición química de los alimentos, para conocer cuales sustancias están presentes (proteínas, grasas, vitaminas, minerales, hidratos de carbono, contaminantes metálicos, residuos de plaguicidas, toxinas, antioxidantes, etc.) y en qué cantidades estos compuestos se encuentran.

El análisis instrumental brinda poderosas herramientas que permiten caracterizar un alimento desde el punto de vista nutricional y toxicológico, y constituye una disciplina científica de enorme impacto en el desarrollo de otras ciencias como la química, la bioquímica, la agroindustria, las ciencias biomédicas y las ciencias farmacéuticas, por solo mencionar algunas.

La obra Análisis Instrumental de los Alimentos tiene como finalidad explicar los principios y aplicaciones de los métodos ópticos, cromatográficos y potenciométricos más empleados en la evaluación de la calidad físico-química de los alimentos. En el texto se abordan estos temas con un alto grado de actualización y enfoque didáctico de gran utilidad, no solo para los estudiantes y profesionales de las Ciencias Alimentarias, sino también para todos aquellos de especialidades afines que se desempeñen en el campo de la Química Analítica.

Héctor Manuel Zumbado Fernández (1962-). Cubano. Doctor en Ciencias Pedagógicas (2005), Master en Ciencias de la Educación Superior (1999). Master en Ciencia y Tecnología de los Alimentos (1998). Licenciado en Alimentos (1985).

Autor de más de 40 publicaciones científicas y 5 libros de texto. Premio Anual de la Academia de Ciencias de Cuba (2002); ostenta la Distinción por la Educación Cubana y la Medalla Rafael María de Mendive. En la actualidad labora como docente en la Universidad Técnica de Manabí, Portoviejo, Ecuador.

EdUniv
Editorial Universitaria